

**Aus der  
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Direktor: Prof. Dr. med. Peter Falkai**

**Genetische Ursachen der Schizophrenie  
Die Bedeutung von Veränderungen im Dysbindin-1-Gen  
(DTNBP1)**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Monika Stiehl

aus  
Rüsselsheim

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dan Rujescu

Mitberichterstatterin: Prof. Dr. Ortrud Steinlein

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. hum. biol. Ina Giegling

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Oktober 2015

*„Der Fortgang der wissenschaftlichen Entwicklung  
ist im Endeffekt eine ständige Flucht  
vor dem Staunen!“*

Albert Einstein

Gewidmet all meinen Lieben!

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	1
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	4
<b>1 EINLEITUNG</b>	7
<b>1.1 Schizophrenie</b>	7
1.1.1 Definition	7
1.1.2 Historie	7
1.1.3 Epidemiologie	8
1.1.4 Krankheitsbild und Diagnose	10
1.1.5 Verlauf und Prognose	12
1.1.6 Ätiopathogenese	13
1.1.6.1 Neuropathologische Faktoren und morphologische Befunde	14
1.1.6.2 Neurochemische Faktoren	17
<b>1.2 Genetik in der Schizophrenie</b>	20
1.2.1 Familien-, Adoptions- und Zwillingsstudien	21
1.2.2 Identifizierung suszeptibler chromosomaler Regionen	22
1.2.3 Kopplungsstudien	23
1.2.4 Assoziationsstudien	24
1.2.5 Ergebnisse der Lokalisierung von Kandidatengenen	27
<b>1.3 Dysbindin-1 und Schizophrenie</b>	29
1.3.1 Dysbindin-1: Gen und Protein	29
1.3.2 DTBPN1 im Gehirn	31
1.3.3 Assoziationsuntersuchungen am DTNBP1-Gen	35
<b>1.4 Fragestellung</b>	47
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	48
<b>2.1 Studienvoraussetzungen</b>	48
<b>2.2 Studienpopulation</b>	48
2.2.1 Kontrollgruppe	48
2.2.2 Patientengruppe	49
<b>2.3 DNA-Extraktion</b>	53
<b>2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration</b>	56

<b>2.5 Genotypisierung</b>	57
2.5.1 Beschreibung der untersuchten SNPs	57
2.5.2 iPLEX-Verfahren: initiale PCR	61
2.5.3 iPLEX-Verfahren: Dephosphorylierung	63
2.5.4 iPLEX-Verfahren: Primer-Extensionsreaktion	63
2.5.5 MALDI-TOF-Verfahren	65
2.5.5.1 Vorbereitung der Proben	65
2.5.5.2 MALDI-TOF-Messung	66
<b>2.6 Statistische Auswertung</b>	67
 <b>3 ERGEBNISSE</b>	 69
3.1 Prüfung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts	69
3.2 Ergebnisse der untersuchten SNPs im DTNBP1-Gen	70
3.2.1 Genotypverteilungen	70
3.2.2 Allelverteilung des Gesamttallels	73
3.2.2.1 Patienten gesamt vs. Kontrollen	73
3.2.2.2 Patienten mit psychiatrischen Störungen in der Familie vs. Kontrollen	73
3.2.2.3 Patienten mit schizophrenen Störungen in der Familie vs. Kontrollen	74
3.2.2.4 Patienten mit schizophrenen Störungen bei Erstgrad-Familienangehörigen vs. Kontrollen	75
3.2.3 Untersuchung des selteneren Allels auf Dominanz	75
3.2.4 Untersuchung des selteneren Allels auf Rezessivität	78
3.2.5 Zusammenfassung der Einzelergebnisse	81
 <b>4 DISKUSSION</b>	 83
4.1 Überblick	83
4.2 Überprüfung der Ergebnisse mit den HapMap-Stichproben	85
4.3 Vergleich der Ergebnisse mit den Vorgängerstudien	89
4.4 Überlegungen zu limitierenden Faktoren	101
4.5 Ausblick	104

<b>ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE .....</b>	<b>105</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>107</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>138</b>

### Zusammenfassung

Die Schizophrenie ist eine der schwerwiegendsten psychiatrischen Erkrankungen mit weit reichenden psychischen und sozialen Auswirkungen auf die betroffenen Patienten und ihre Angehörigen. Die Lebenszeit-Prävalenz beträgt etwa 1%. Die Ergebnisse von Kopplungs- und Assoziationsuntersuchungen zeigen den starken Einfluss einer genetischen Komponente bei der Entstehung der Krankheit. Die bisherigen Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass es sich bei der Schizophrenie um eine genetisch komplexe Erkrankung handelt, deren Ätiologie sich durch das Zusammenwirken von Umweltfaktoren und genetischen Faktoren auszeichnet. Bislang ist es noch nicht gelungen, alle an der Pathogenese beteiligten Faktoren, vor allem aber die Mechanismen ihres Zusammenspiels zu entschlüsseln. Aufgrund von morphologischen und molekularbiologischen Untersuchungen sowie genetischen Kopplungs- und Assoziationsstudien fand sich eine Reihe von Suszibilitätsgenen für Schizophrenie, darunter auch das Gen DTNBP1. Es ist auf dem Chromosom 6 in der Region 22.3 lokalisiert und kodiert für das Protein Dysbindin-1. Im Gehirn nimmt dieses Protein Einfluss auf das Zytoskelett und die synaptische Plastizität und ist an der Signaltransduktion von Neuronen über NMDA- und GABA-Rezeptoren und damit am Glutamat- und Dopaminstoffwechsel beteiligt (Benson et al. 2001; Harrison und Weinberger, 2005). Morphologische Untersuchungen zeigen, dass die Konzentration von Dysbindin-1 in wichtigen Bereichen des Gehirns bei schizophrenen Patienten vermindert ist (Talbot et al. 2004; Tang et al. 2009). Eine Reihe von Assoziationsstudien, teils auch familienbasiert, haben in unabhängigen Kollektiven mit verschiedenem ethnischen Hintergrund signifikante Assoziationssignale an unterschiedlichen Varianten im DTNBP1-Gen gefunden (Straub et al. 2002b; van den Oord et al. 2003; Schwab et al. 2003; Morris et al. 2003; van den Bogaert et al. 2003; Tang et al. 2003; Kirov et al. 2004; Williams et al. 2004; Numakawa et al. 2004; Funke et al. 2004; de Luca et al. 2005; Duan et al. 2007; Riley et al. 2009 und Voisey et al. 2010). Dabei handelte es sich teilweise um Einzelbasen-Polymorphismen oder Haplotypen im DTNBP1-Gen, die sich als signifikant mit Schizophrenie assoziiert gezeigt haben. Folgestudien konnten diese Ergebnisse oftmals aber nicht bestätigen (Turunen et al. 2006, Datta et al. 2007, Joo et al. 2007, Holliday et al. 2006, Peters et al. 2008, Sanders et al. 2008; Strohmaier et al. 2010).

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die sechs Einzelbasenpolymorphismen, rs3213207, rs2619538, rs1011313, rs1047631, rs2056943 und rs2619522 untersucht. Bei ihnen hatten sich in Studien zuvor teilweise deutliche Assoziationsbefunde gezeigt. Die Marker wurden hier erneut an einem unabhängigen kaukasischen Kollektiv von 503 Patienten und 1290 gesunden Kontrollpersonen untersucht. Zusätzlich wurde die Patientengruppe in vier verschiedene Kategorien unterteilt, je nachdem ob Angehörige mit psychischen Störungen, mit Schizophrenie oder Angehörige 1. Grades mit Schizophrenie in der Familienanamnese vorlagen, sowie als vierte Gruppe das Patientenkollektiv insgesamt. Dabei zeigten sich in den unterschiedlichen Patientengruppen signifikante Assoziationshinweise und Trends zur Assoziation bei den Markern rs3213207 und rs2619538, der Marker rs1011313 zeigte lediglich Trends zur Assoziation mit Schizophrenie. Die höchste Signifikanz erreichte mit einem p-Wert von 0,034 der Marker rs3213207 in der Gruppe der Patienten mit schizophrenen Angehörigen. Hier trat der heterozygote Genotyp A/G signifikant häufiger bei Patienten auf als die homozygoten Genotypen A/A und G/G. Ebenfalls Signifikanzniveau erreichte der Marker rs2619538. Dabei zeigte sich in der Gruppe der Patienten mit schizophrenen Angehörigen ersten Grades ein signifikant niedrigerer Anteil homozygoter Träger des selteneren Allels Adenin bei einem p-Wert von 0,044. Die Marker rs1047631, rs2056943 und rs2619522 zeigten in dieser Arbeit keine Hinweise auf Assoziation mit Schizophrenie.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit und der anderer Forschungsgruppen besteht weiterhin Grund zur Annahme, dass es sich bei DTNBP1 um ein Suszeptibilitäts-Gen für Schizophrenie handelt. Zwar konnten auch in dieser Arbeit die positiven Assoziationsergebnisse von Vorläuferstudien nicht in vollem Umfang repliziert werden, jedoch stützen die Ergebnisse die Annahme, dass Variationen im DTNBP1-Gen an der Pathogenese der Schizophrenie beteiligt sind. Dabei weisen die Ergebnisse in dieser Arbeit durchaus darauf hin, dass es einen Zusammenhang gibt zwischen positiver Familienanamnese in Bezug auf Schizophrenie und genetischen Variationen im DTNBP1-Gen. Gründe für die Inkonsistenz in den Ergebnissen der bisherigen Untersuchungen könnten die abweichenden Stichprobengrößen sowie die unterschiedliche ethnische Herkunft der untersuchten Kollektive sein. Auch die Einschlusskriterien für die Patienten- und Kontrollgruppen wichen voneinander ab. Vermutlich aber ist eine der Hauptursachen auch die genetische und phänotypische Heterogenität der



## Zusammenfassung

Erkrankung an Schizophrenie. Weitere Studien mit höheren Fallzahlen werden nötig sein, um die genetischen Risikomarker auf dem DTNBP1-Gen und ihr mögliches Zusammenspiel mit Markern auf anderen Genen genauer zu detektieren.

# 1 Einleitung

## 1.1 Schizophrenie

### 1.1.1 Definition

Die Schizophrenie, eine der schwerwiegendsten psychiatrischen Erkrankungen, gehört zur Gruppe der endogenen Psychosen. Psychosen sind psychische Erkrankungen, die durch das Auftreten von Wahnvorstellungen, Halluzinationen, Realitätsverlust, Bewusstseinsstörungen sowie Störungen des Denkens, der Gefühlswelt und der Psychomotorik charakterisiert sind (Arolt et al. 2006).

Im Unterschied zu organisch begründbaren Psychosen, wie z.B. das organische Psychosyndrom, bei denen organische Schädigungen vorliegen, liegen die Ursachen der endogenen Psychosen in einer Vielzahl von Faktoren, die „endogen“, d.h. durch „das Innere“ des Patienten bedingt sind und Veränderungen im Hirnstoffwechsel zur Folge haben. Charakteristisch für die Schizophrenie ist dabei die Vielgestaltigkeit der Symptome, der Neuropathologie und des Verlaufs der Krankheit (Tandon et al. 2008).

### 1.1.2 Historie

Sehr frühe Beschreibungen des Krankheitsbildes finden sich bereits zu Beginn des 19. Jahrhundert durch den französischen Arzt Philippe Pinel (Pinel 1801) und den britischen Apotheker John Haslam (Haslam 1809). Rund 90 Jahre später prägte der Münchner Psychiatrieprofessor Emil Kraepelin den Begriff der „Dementia Praecox“. Er unterschied zwischen exogenen und endogenen Psychosen und stellte die für endogene Psychosen charakteristischen, meist fortschreitenden Störungen des Denkens und den frühzeitigen, ebenfalls progredienten, Abbau der intellektuellen Fähigkeiten in den Mittelpunkt. Erstmals begründete er so eine Systematik psychischer Erkrankungen, in dem er den Gesamtverlauf der Krankheit in den Vordergrund stellte (Kraepelin 1896). Damit wurde der Grundstein für die modernen Diagnosekriterien einer schizophrenen Störung nach ICD-10 und DSM-IV gelegt. Der Züricher Psychiatrieprofessor Eugen Bleuler benannte im Jahr 1911 die charakteristischen Symptome der Schizophrenie aus den Bereichen des Denkens aber auch des Antriebs und der Affektivität. Auf ihn geht auch der Begriff der „Schizophrenie“ zurück. Er leitet sich aus dem Altgriechischen ab. Dabei bedeutet *σχίζειν*, *schizein*, „abspalten“ und *φρῆν*,

phren, „Zwerchfell, Seele, Bewusstsein“. Bleuler sah die Schizophrenie in einer Art Bewusstseinsspaltung im Sinne eines Mangels an Einheit der Persönlichkeit bei an Schizophrenie erkrankten Patienten und bezog sich somit auf das psychopathologische Querschnittsbild der Schizophrenie. Er unterschied *Grundsymptome* wie formale Denkstörungen, Störungen der Affektivität, Antriebsstörungen und Autismus von den *akzessorischen Symptomen* wie Wahn, Halluzinationen und katatonen Symptomen (Bleuler 1911). Dieses Konzept wurde dann 1959 von Kurt Schneider im Sinne einer noch intensiveren Systematisierung der Psychopathologie weiterentwickelt und prägt die Diagnosesysteme ICD-10 und DSM-IV.

Schneider unterschied Symptome ersten und zweiten Ranges (Schneider 1959). Zu den Symptomen ersten Ranges zählte er unter anderem Ich-Störungen und akustische Halluzinationen und Wahnvorstellungen. Zu den Symptomen zweiten Ranges gehörten vor allem die Veränderungen des Affektes und sonstige Halluzinationen. Die seit den 70er Jahren gerade im Zusammenhang mit der medikamentösen Therapie schizophrener Erkrankungen immer wichtiger gewordene Unterscheidung in Negativ- und Positiv-Symptomatik geht auf John Hughlings Jackson (Jackson 1931) zurück. Er unterschied *positive Symptome* wie Halluzinationen, Wahnvorstellungen, Ich-Erlebnisstörungen und formale Denkstörungen von den *negativen Symptomen* Apathie, Alogie, sozialer Rückzug, Anhedonie, Affektverflachung und Aufmerksamkeitsstörung.

### 1.1.3 Epidemiologie

Die jährliche Inzidenz der Schizophrenie in der Bevölkerung, also die Anzahl der Neuerkrankungen an Schizophrenie innerhalb eines Jahres, liegt weltweit bei durchschnittlich 15 pro 100,000 und das Risiko, einmal im Leben an Schizophrenie zu erkranken liegt zwischen 0.7% und knapp einem Prozent (Stilo und Murray 2010; Tandon et al. 2008b; Perälä et al. 2007, Saha et al. 2005, Mc Grath et al., 2004, Jablensky 2003). Eine Metaanalyse von 55 Studien mit Daten aus 33 Ländern zeigte keine weltweit keine nennenswerten Unterschiede bei den Erkrankungshäufigkeiten (Jablensky 2003) auch im Hinblick auf ökonomischem oder sozioökonomischem Status der Patienten (Saha et al. 2006, Häfner 1993; Tsuang et al. 1995). Darauf hatten zuvor auch die Daten der American Psychiatric Association zu den weltweiten Prävalenzraten hingewiesen (American Psychiatric Association. *Task Force on DSM-IV*,

1994). Über die Geschlechterverteilung existieren unterschiedliche Studien mit teils widersprüchlichen Ergebnissen. Ältere Studien zeigen, dass Männer und Frauen etwa gleich häufig betroffen sind (Jablensky und Cole 1997). Jüngere Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass Männer ein höheres Risiko als Frauen haben, an Schizophrenie neu zu erkranken (Aleman et al. 2003; McGrath et al. 2004). So zeigt die Arbeit von McGrath ein Risikoverhältnis Männer zu Frauen von 1,4 zu 1, wobei hier die Inzidenzen für Schizophrenie insgesamt etwas geringer ausfallen als in anderen Studien. Sie variieren zwischen 0,0077% und 0,043% (McGrath 2005). Als Grund für das etwas geringere Krankheitsrisiko von Frauen wird unter anderem eine mögliche protektive Wirkung von Östrogen diskutiert (Häfner et al. 2013; Häfner 1995a)

Dagegen zeigten Metaanalysen keine bedeutsamen Unterschiede der Inzidenzen zwischen verschiedenen geographischen, ethnischen und soziokulturellen Gruppen (Saha et al., 2006; Tsuang und Tohen 2002), allerdings aber ein erhöhtes Neuerkrankungsrisiko bei Menschen, die in Städten leben. So geht ein urbanes Umfeld mit einem größeren Erkrankungsrisiko einher (Brown 2011a; McGrath and Scott 2006). Als Gründe dafür werden diskutiert, dass sich durch Einflüsse des städtischen Lebens, wie z.B. mehr Lärm oder Stress die Suszeptibilität für Schizophrenie erhöht (*breeder hypothesis*). Es ist aber auch denkbar, dass an Schizophrenie Erkrankte eine urbane Umgebung präferieren (*selection hypothesis*) (Tandon et al. 2008).

Das Prädilektionsalter der Schizophrenie liegt zwischen der Pubertät und etwa dem 30. Lebensjahr, wobei Männer meist etwas früher erkranken als Frauen. So ist das Haupterkrankungsalter bei Männern zwischen dem 20. und 24. Lebensjahr, bei Frauen im Schnitt zwischen dem 29. und 32. Lebensjahr (Häfner et al. 2013; Stilo und Murray 2010; Häfner 1998). Dabei variiert das Alter der Erstmanifestation zwischen den einzelnen Subtypen der Erkrankung deutlich. Der Häufigkeitsgipfel der hebephrenen Schizophrenie liegt im Jugendalter, der der paranoid-halluzinatorischen Schizophrenie dagegen im vierten Lebensjahrzehnt (Möller et al. 2013). Epidemiologisch auffällig ist die jahreszeitliche Verteilung des Geburtsdatums schizophrener Patienten. Sie weist sowohl in den Ländern der nördlichen als auch der südlichen Halbkugel eine überzufällige Häufung von Geburten im späten Winter und Frühjahr auf (Davis et al. 2003; Hettema et al. 1996). In einigen Studien ist von einem Anstieg des Erkrankungsrisikos um das 1,2 bis 1,5fache die Rede (Lewis 1989; Torrey und

Bowler 1990). Hier wird als mögliche Erklärung diskutiert, dass eine Geburt in den Wintermonaten mit einem antenatal erhöhten Expositionsrisiko von ubiquitär vorkommenden Keimen, wie beispielsweise Influenza- oder Coxsackie-Viren, für die Feten im ersten und frühen zweiten Trimenon einhergeht (Brown 2011; Meyer et al. 2008; Penner und Brown 2007). Solche intrauterinen Infektionen, denen Wintergeborene vermehrt ausgesetzt sind, könnten die neuronale Entwicklung des Feten negativ beeinflussen.

Besonders häufig von Schizophrenie betroffen sind auch Personen mit niedrigen Bildungsabschlüssen und unterer sozioökonomischer Schichtzugehörigkeit (Werner et al. 2007, Messias 2007). Darin ist aber nicht unbedingt Grund, sondern vielmehr eine Folge der Erkrankung zu sehen. Denn sie geht oft bereits in einem frühen Stadium mit Verlust von sozialen Kompetenzen oder intellektuellen Fähigkeiten einher, die ein Abrutschen in tiefere soziale Schichten (*Drift-Hypothese*) (Wiersma et al. 1996) sowie zunehmende soziale Isolation und schlechtere Chancen auf dem Arbeitsmarkt zur Folge haben (Agerbo et al. 2004). Nur etwa 30% der an Schizophrenie erkrankten Menschen leben in einer festen partnerschaftlichen Beziehung, nur 15% schaffen es, auch längerfristig eine feste Arbeit auf dem primären Arbeitsmarkt zu finden und sie auch zu bewältigen (Falkai und Maier 2006).

### 1.1.4 Krankheitsbild und Diagnose

Aufgrund des vielgestaltigen Krankheitsbildes der schizophrenen Psychosen wird auch von den „Krankheiten des schizophrenen Formenkreises“ gesprochen. Je nach Ausprägung und Symptomatik werden verschiedene Subtypen schizophrener Störungen unterschieden. Zu den wichtigsten Formen zählen die paranoid-halluzinatorische, die katatone und die hebephrene Schizophrenie. Sie differieren nicht nur in der typischen Symptomatik, sondern auch in Verlauf und Prognose (Tandon 2009). Allgemein sind die schizophrenen Störungen durch grundlegende und charakteristische Störungen von Denken und Wahrnehmung sowie durch inadäquate oder verflachte Affektivität gekennzeichnet. Derzeit gibt es zwei anerkannte Klassifikationssysteme. Die Internationale Klassifikation psychischer Störungen oder *International Statistical Classification of Diseases* (ICD-10) der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation, WHO*) ist im klinischen Bereich des deutschsprachi-

gen Raums gebräuchlich und rechtsgültig. Die Diagnostik nach ICD-10 (WHO 2004) verbindet Kraepelins Hinweise auf den Verlauf mit den Symptomen nach Schneider und Bleuler. Dabei sind vor allem die Symptome ersten Ranges wie die akustischen Halluzinationen (Kommentar-, Dialog- oder Imperativstimmen), Störungen des Ich-Erlebens (Gedankenbeeinflussung, Verlust der Meinhaftigkeit der Ich-Grenzen im Sinne (i.S.) von Verlust der personalen Identität und der eigenen Gefühle) und Veränderungen der Wahrnehmung (Wahnwahrnehmung) für die Diagnose einer Schizophrenie entscheidend. Das *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM), herausgegeben von der *American Psychiatric Association* in der 4. Auflage (DSM-IV), wird vor allem im angloamerikanischen Raum und zu Forschungszwecken angewandt. Es ist mehr symptomorientiert und setzt striktere diagnostische Kriterien voraus. Auch wird im DSM-IV der Unterscheidung zwischen Positivsymptomatik (Wahnvorstellungen, Halluzinationen und Ich-Erlebnis-Störungen) und Negativsymptomatik (Affektverflachung, Alogie, Willensschwäche) Rechnung getragen. Diese Unterscheidung spielt in der neueren Diskussion über die Psychopathologie schizophrener Erkrankungen eine wichtige Rolle.

Zur Diagnose nach dem DSM-IV müssen Symptome der Schizophrenie mindestens über einen Zeitraum von sechs Monaten vorhanden sein, zwei der folgenden fünf Kriterien dabei einen Monat oder länger bestehen. Dabei dürfen keine organische Erkrankung oder eine psychotrop wirkende Substanz für die Symptome verantwortlich sein.

1. Wahn
2. Halluzinationen
3. Desorganisierte Sprechweise (häufiges Entgleisen, Zerfahrenheit)
4. Grob desorganisiertes oder katatonies Verhalten
5. Negative Symptome (flacher Affekt, Alogie, Anhedonie, Willensschwäche)

Nur eines der o.g. Symptome ist erforderlich, wenn der Wahn bizarr ist oder die Halluzinationen aus einer kommentierenden Stimme oder aus einem Dialog bestehen.

Die übrige Zeit und prodromale und residuale Perioden können durch ausschließlich negative Symptome gekennzeichnet sein, wie z.B. sozialem Rückzug, beeinträchtigtem Leistungsvermögen, flachem oder unangemessenem Affekt, vager und umständlicher Sprache oder Beeinträchtigung der Selbstfürsorge und Hygiene. Diese Symp-

tome können sich auch abgeschwächt manifestieren (seltsame Überzeugungen, ungewöhnliche Wahrnehmungserlebnisse).

Kay et al. entwickelten 1987 die Positiv- und Negativ-Syndrom Skala (PANSS), die eine noch präzisere Zuordnung von Symptomen in positive und negative ermöglicht. Zur Positivsymptomatik werden Wahn, Größen- und Verfolgungsideen, Halluzinationen, formale Denkstörungen, Erregung und Feindseligkeit gezählt. Zu den Negativsymptomen gehören Affektverflachung, Mangel an affektivem Rapport oder Spontanität und Flüssigkeit der Sprache, Schwierigkeiten beim abstrakten Denken, stereotype Gedanken, soziale Passivität und emotionaler Rückzug (Kay et al. 1987).

### **1.1.5 Verlauf und Prognose**

Die Schizophrenie gehört zu den Krankheiten mit den schwersten Folgen und führt trotz Therapie oft zu Arbeitsunfähigkeit und Frühberentung. Unter den psychiatrischen Erkrankungen gehört sie zu den teuersten in Deutschland, wobei die Kosten auf 4,4 bis 9,2 Milliarden Euro pro Jahr geschätzt werden und damit mit denen somatischer Volkskrankheiten wie Diabetes oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen vergleichbar sind (Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2010). Schizophrenie kann akut auftreten oder auch schleichend mit einem oftmals chronischen Verlauf. Dem Vollbild der Erkrankung gehen in den Monaten oder auch Jahren vor dem akuten Ausbruch oftmals unspezifische Prodromalsymptome voraus (Schenkel und Silverstein 2004). Dabei handelt es sich beispielsweise um vermehrten sozialen Rückzug, den Verlust von Interessen, Antriebslosigkeit, Schlafstörungen, steigendes Misstrauen, Trugwahrnehmungen oder erhöhte Anspannung (Häfner 1995b).

Longitudinalstudien in entwickelten Ländern zeigten, dass 19 bis 35 Prozent der Menschen mit solchen Prodromalsymptomen innerhalb von einem bis zweieinhalb Jahren erstmals eine Psychose erleiden (Ruhrmann et al. 2010; Cannon et al. 2008; Yung et al. 2003). Die Erkrankung kann schubweise verlaufen, wobei nach mehreren Manifestationen häufig eine chronische Residualsymptomatik bestehen bleibt. Dabei tendiert die Positivsymptomatik bei chronischen Verläufen dazu, mit der Zeit etwas an Stärke zu verlieren, während die Negativsymptomatik mehr an Dominanz gewinnt (Tandon et al. 2008b). Es muss aber nicht zwingend zu einer Chronifizierung der

Krankheit kommen. So gibt es auch phasische Verläufe mit völliger Remission. Es gilt die so genannte Drittelregel (Riedel und Möller 2007; Shepherd et al. 1989). Danach erkrankt rund ein Drittel der Patienten an einer einmaligen Episode, die sich vollständig zurück bildet und ohne Folgen bleibt. Rund ein weiteres Drittel erkrankt mehrmals mit stabilem Residuum und Remission im Intervall. Der Verlauf beim letzten Drittel ist ebenfalls rezidivierend und zeigt einen chronischen Verlauf mit bleibenden und sich progressiv entwickelnden Beeinträchtigungen. Es zeigte sich, dass Menschen, die in Familien mit „*High Expressed Emotions*“ leben, höhere Rückfallraten haben (Möller et al. 2013; Butzlaff und Hooley 1998; Bebbington et al. 1994). Unter dem Begriff „*High Expressed Emotions*“ versteht man einerseits emotionales Überengagement, andererseits vermehrte Kritik und Feindseligkeit gegenüber dem Erkrankten innerhalb der Familie. Insgesamt leiden trotz verbesserter Behandlungsmöglichkeiten auch heute noch mehr als 50% der an Schizophrenie Erkrankten unter einem ungünstigen Verlauf mit Rezidiven und Residualsymptomatik, der eine Rückkehr zum prämorbidem Leistungsniveau verhindert und oftmals mit einem steilen sozialen Abstieg verbunden ist (Tandon et al. 2008b). Die Morbidität von schizophrenen Patienten ist zwei- bis dreifach erhöht im Vergleich zur Normalbevölkerung (Laursen et al. 2012; Meyer und Nasrallah 2009; Saha et al. 2007; Seemann 2007; Harris und Barraclough 1998). Ihre Lebenszeit ist im Schnitt um etwa 10 bis 25 Jahre verkürzt. Dabei ist Suizid der Hauptgrund für einen vorzeitigen Tod bei schizophrenen Patienten (Roy et al. 2009, Pompili et al. 2008). Suizidalität unter schizophrenen Patienten ist deutlich höher als in der Allgemeinbevölkerung, das Suizid-Risiko beträgt rund 5% (Hor und Taylor 2010). Etwa ein Drittel der Erkrankten unternehmen einen oder mehrere Suizidversuche, etwa 5% sterben dabei (Pompili et al. 2008; Hawton et al. 2005; Palmer et al. 2005).

### **1.1.6 Ätiopathogenese**

#### **1.1.6.1 Überblick**

Gängige Theorien gehen bei der Schizophrenie von einer multifaktoriellen Krankheitsentstehung im Sinne eines Zusammenwirkens von konstitutionellen, prädisponierenden und umweltbedingten Faktoren aus (Tandon et al. 2008). Dabei ist der stärkste ausgemachte Risikofaktor für die Erkrankung an Schizophrenie bislang die familiäre Belastung. So belegen die Ergebnisse von Familien-, Zwillings- und Adopti-



onsstudien eine starke, genetisch bedingte Vulnerabilität (Cardno et al. 1999; Cardno und Gottesmann 2000; Tsuang et al. 2002; Cloninger 2002, Sullivan et al. 2003), die daher in den Mittelpunkt der aktuellen Forschung gerückt ist.

Offenbar reichen in den meisten Fällen aber weder die Erbanlage noch die Umweltfaktoren alleine aus, eine Schizophrenie auszulösen. Wie das „Vulnerabilitäts-Stress-Modell“ beschreibt, führt erst das Überschreiten einer multifaktoriellen Schwelle zum Ausbruch der Krankheit (Sawa und Snyder 2002). Zu den nicht genetisch bedingten Risikofaktoren zählen prä- und perinatale Komplikationen. So berichteten Mütter schizophrener Patienten fast dreimal häufiger über Komplikationen während der Schwangerschaft oder perinatal als Mütter gesunder Kinder (Cannon et al. 2002; Geddes et al. 1999; Verdoux et al. 1997). Vor allem Infektionen während der Schwangerschaft und der Kindheit mit Influenza-, Coxsackie-, Toxoplasmose-, Herpes simplex-, Varicella Zoster- und Zytomegalieviren werden in diesem Zusammenhang als Risikofaktor für Schizophrenie diskutiert (Brown 2011; Brown und Derkits 2010; Leweke et al. 2004; Dickerson et al. 2003; Buka et al. 2001; Watson et al. 1984). Aber auch Drogen- insbesondere Cannabisabusus (Moore et al. 2007) sowie psychosoziale Faktoren, wie z.B. Migration, das Aufwachsen in Großstädten, familiäre Interaktionen oder auch unspezifischer Alltagsstress (Brown 2011a; McGrath and Scott 2006; Cantor-Graae und Selten 2005; Cannon et al. 2002; Bayer 1999 Hultman et al. 1997) erhöhen das Risiko einer Erkrankung an Schizophrenie.

### **1.1.6.2 Neuropathologische Faktoren und morphologische Befunde**

Mit Hilfe moderner, bildgebender Verfahren wie CT und MRT konnten mittlerweile *in vivo* in einer Vielzahl von Studien verschiedene strukturelle Veränderungen im ZNS nachgewiesen werden, die bei der Pathogenese der Schizophrenie von Bedeutung sein könnten (s.u.). Sie liefern die Grundlage für die Diskussion, inwiefern möglicherweise Störungen in der Gehirnentwicklung aufgrund perinataler Schädigungen, bedingt durch exogene Faktoren, wie z.B. Sauerstoffmangel oder auch pränatale Infektionen, Ursache dieser strukturellen Veränderungen sein könnten. Daneben werden auch neurodegenerative Prozesse als Grund für die beobachteten morphologischen Veränderungen diskutiert. Zudem könnten auch endogene, z.B. genetische Faktoren eine Rolle spielen, die im Sinne einer Vulnerabilitätsentwicklung die Reifung

des Gehirns in der Embryonalzeit und in den ersten Lebensjahren behindern oder verzögern.

In fast allen bedeutenden Hirnarealen schizophrener Patienten wurden mittlerweile Abweichungen von Volumina festgestellt. In Metaanalysen (Bora et al. 2011, Ellison-Wright und Bullmore 2010) zeigt die Auswertung von Studien neuroanatomischer, zumeist kernspintomografischer Untersuchungen von Gehirnen schizophrener Patienten auffällige Volumenverluste vor allem der grauen Substanz. Dabei waren bilateral die Bereiche der Insula, des frontalen Kortex, des Gyrus temporalis, des Gyrus Cingularis, sowie im Thalamus und der Amygdala betroffen. Ellison-Wright und Bullmore stellten zudem eine auffällige Zunahme der grauen Substanz im Bereich der Basalganglien fest. Auffällig war in der Studie von Bora et al. (2011), dass der Verlust an grauer Substanz bei männlichen Patienten, bei chronischen Kranken sowie bei Patienten mit Negativsymptomatik stärker ausfiel als bei anderen. Es wurden zudem Volumenverluste in der weißen Substanz festgestellt vor allem in Regionen, die Verbindungen zwischen den beiden Hemisphären herstellen (Bora et al. 2011).

Auch andere Studien weisen auf Volumenverluste in Gehirnen schizophrener Patienten hin, allerdings fehlen zumeist noch eindeutige für Schizophrenie spezifische neuroanatomische Befunde (Arolt et al. 2006). Oftmals gibt es Überschneidungen zu den Befunden gesunder Kontrollpersonen oder jenen anderer psychiatrischen Erkrankungen. Und nur bei etwa einem Fünftel der Patienten werden überhaupt hirnstrukturelle Veränderungen beobachtet (Iritani 2007).

Zu den auffälligsten morphologischen Veränderungen in den Gehirnen schizophrener Patienten gehören die Erweiterungen des Ventrikelsystems, vor allem im Bereich des dritten Ventrikels und der Seitenventrikel, meist linksbetont im Bereich der Temporalhörner (Arolt et al. 2006; Hulshoff et al. 2002; Hendren 2000; Wright et al. 2000, Harrison 1999; Johnstone et al. 1976;). Die Ursache des Phänomens liegt vermutlich in einer Verringerung der Anzahl der Zellen, die den Ventrikelräumen benachbart sind. Interessant dabei ist, wie auch die oben erwähnte Studie von Bora et al. zeigt (2011) die Region des Thalamus, der dem dritten Ventrikel benachbart ist, aber auch des Hippocampus, der Amygdala, des Gyrus cingulum und der temporalen Gyri. Speziell der Volumenverlust im Gyrus temporalis anterior superior wurde zuvor schon mit akustischen Halluzinationen in Zusammenhang gebracht (Rajarethinam et al. 2000). Weiterhin gibt es Anhaltspunkte für eine Volumenreduktion des Cerebellum (Rasser et al. 2010; Keller et al. 2003). Die Volumenverluste betreffen zumeist die graue Sub-

stanz (Bora et al. 2011; Baiano et al. 2007; McCarley et al. 1999; Wright et al. 2000). Teilweise sind sie bereits in sehr frühen Stadien der Erkrankung zu beobachten und bestehen im Verlauf der Erkrankung fort (Keshavan et al. 2008), was der Hypothese einer progredienten Neurodegeneration widersprechen würde. Es gibt aber auch Untersuchungsergebnisse anderer Studien, die eine fortschreitende Entwicklung beim Verlust kortikaler grauer Substanz zeigen (Cahn et al. 2002; Thompson et al. 2001). Gegen die Annahme eines neurodegenerativen Prozesses wie bei Morbus Alzheimer oder Multipler Sklerose sprechen auch Befunde von post mortem Untersuchungen der Gehirne schizophrener Patienten, in denen keine Gliose nachgewiesen werden konnte (Falkai et al. 1999). Eine Gliose ist bei neurodegenerativen Erkrankungen ein Marker für den Zelltod von Neuronen. Insgesamt konnte aber noch nicht abschließend geklärt werden, ob die hirnstrukturellen Veränderungen schizophrener Patienten neurodegenerative Ursachen haben oder ihnen eine frühe Hirnentwicklungsstörung zugrunde liegt. Möglicherweise könnten beide Ansätze auch komplementär gelten. Für die Hypothese einer Hirnentwicklungsstörung bereits im Mutterleib sprechen Beobachtungen zu Gyrfikationsstörungen im Sinne von Hypo- oder Hypergyrfikation in Regionen des multimodalen Assoziationskortexes, der Insularegion sowie präfrontalen und frontalen Gehirnnarealen (Palaniyappan und Liddle 2012; Falkai et al. 2007; Vogeley et al. 2000). Die Hirnwindungen entwickeln sich zwischen der 20. und der 24. Schwangerschaftswoche. Danach ist die Gyrfikation abgeschlossen und kann von exogenen Faktoren auch postnatal nicht mehr gestört werden (Vogeley und Falkai 1998).

Für die Hypothese einer genetisch bedingten Vulnerabilität sprechen die Ergebnisse über Volumenveränderungen vor allem im Bereich des Hippocampus und der Liquorräume bei gesunden Angehörigen schizophrener Patienten (Falkai und Maier 2006 ; Falkai et al. 2003; Keshavan et al. 2008). Aber auch bei der Messung des gesamten Volumens des Gehirns zeigten Studienergebnisse sowohl bei der Mehrzahl schizophrener Patienten (Shenton et al. 2001) als auch bei der Mehrzahl ihrer nahen Verwandten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (Keshavan et al. 2008) eine Reduktion.

In der funktionellen Bildgebung zeigten sich verminderte Durchblutung und Hypometabolismus im Bereich des Frontalhirnes (Franzen 1975; Carter et al. 1998). Auffällig waren Veränderungen im lateralen präfrontalen Kortex, der für Arbeitsgedächtnis und Exekutivfunktionen verantwortlich ist, dem anterioren Cingulum, das die Aufmerk-

samkeit steuert, in sensorischen Arealen im Bereich des visuellen und auditorischen Kortex, welche die Wahrnehmung beeinflussen, dem Motorkortex, der die Motorik steuert, dem Hippocampus, der Gedächtnisfunktionen beeinflusst, sowie dem lateralen Temporallappen, der für Sprachverständnis und Sprachproduktion verantwortlich ist (Kircher et al. 2004). Neuere Messungen mittels Protonen-Magnetresonanztomographie zeigten Abweichungen in der Konzentration des Neurotransmitters Glutamat. So wurden im anterioren Cingulum niedrigere Glutamat-Konzentrationen festgestellt (Gallinat und Gudlowski 2008), während in der hippocampalen Region und im Bereich des rechten präfrontalen Kortex erhöhte Glutamat-Konzentrationen gemessen wurden (Olbrich et al. 2008; Theberge et al. 2002; van Elst et al. 2005).

Des Weiteren wurden in MRT-Untersuchungen schizophrener Patienten Störungen im Stoffwechsel der Nervenzellmembranen und der Myelinisierung sichtbar (Lawrie und Abukmeil 1998). Post mortem durchgeführte histomorphologische Analysen schizophrener Gehirne zeigten Schäden wie Neuronenverluste oder pathologische Zellanordnungen in den zentralen limbischen Strukturen des Temporallappens, im Sinne von Neuronenverlusten im dorsalen Thalamus und Hippocampus sowie Dysplasien im Bereich des entorhinalen Cortex (Scherk et al. 2003; Falkai et al. 2000; Jakob und Beckmann 1986;).

### **1.1.6.3 Neurochemische Faktoren**

Bereits vor über dreißig Jahren stellten Carlson und Snyder die Hypothese auf, dass psychotische Symptome durch einen Überschuss am Neurotransmitter Dopamin im mesolimbischen dopaminergen System verursacht werden (Carlson 1978, Snyder 1976). Die Beobachtung, dass die Blockade zentraler Dopamin-D2-Rezeptoren durch Neuroleptika eine antipsychotische Wirkung hat, untermauert diese Dopaminhypothese (Grace 1992, Horn und Snyder 1971). Auch, dass die Einnahme von Amphetaminen selbst bei gesunden Personen eine schizophrenietypische Positivsymptomatik zur Folge haben kann, spricht dafür, dass dieser Neurotransmitter bei der Entstehung der Schizophrenie eine Rolle spielen könnte. Bei schizophrenen Patienten kann durch die Einnahme von Amphetaminen ein erneuter Ausbruch oder eine Verschlimmerung der Psychose provoziert werden (Kapur 1996; Ross 2006; Möller 2009). Amphetamine sind Dopaminrezeptoragonisten und führen zur verstärkten Freisetzung von Dopamin, bei gleichzeitiger Hemmung der Inaktivierung von Dopa-

min. Dabei sprachen Psychosen, die durch Amphetamine ausgelöst worden waren, besonders schnell auf Neuroleptika an (Snyder 1972, Snyder 1973). Studien wiesen erhöhte Dopaminkonzentrationen vor allem im Bereich von Synapsen im Striatum auf, sowohl nach Gabe von Amphetaminen als auch bei akut psychotischen Schizophrenen ohne Amphetamineinnahme. Dabei zeigten sich teilweise positive Korrelationen zwischen dem Ausmaß der Positivsymptomatik und der Höhe der Dopaminkonzentration (Laruelle et al. 1996; Abi-Dargham et al. 1998; Abi-Dargham et al. 2000).

Die halluzinogene und psychotrope Wirkung von Substanzen wie Meskalin oder Lysergsäurediethylamid (LSD) hingegen ist auf serotonerge Mechanismen zurückzuführen. Diese Substanzen besetzen 5-HT-Rezeptoren und lösen bei Einnahme Symptome einer akuten Psychose aus (Meltzer 1987; Abi-Saab et al. 1998; Gouzoulis-Mayfrank et al. 2005). Dabei kommt es nicht nur zu Wahrnehmungsstörungen wie Trugbildern, Verzerrungen der Realität und Wahnvorstellungen, sondern auch zu der für Schizophrenie typische Negativsymptomatik, wie z.B. sozialer Rückzug oder Apathie. Im Gegensatz zur klassischen Schizophrenie-Symptomatik ist Hauptmerkmal der LSD-Psychose allerdings die visuelle Halluzination. Dagegen sind die für die Schizophrenie typischen formalen Denkstörungen, die zum Negativ-Syndrom gehören, eher rar (Breier 1995). Die Beobachtung solcher LSD-Pychosen führte zur Formulierung der Serotoninhypothese. Sie geht davon aus, dass ein Wegfall der serotonergen Hemmung subkortikaler Strukturen im präfrontalen Kortex zu einer gesteigerten dopaminergen Funktion führt (Laruelle et al. 1992). Gestützt wird diese Annahme durch die antipsychotische Wirkung der atypischen Neuroleptika, die neben dem Dopamin-D2-Rezeptor antagonistisch den Serotonin-Rezeptor 5-HT<sub>2A</sub> hemmen (Ichikawa et al. 2001, Díaz-Mataix et al. 2005, Terry et al. 2008). Sowohl die Dopamin- als auch die Serotoninhypothese allein erklären allerdings die für die Schizophrenie typische Negativsymptomatik nicht.

Die Beobachtung, dass die Glutamat-Antagonisten PCP (Phencyclidin, *angel dust*) und Ketamin durch die non-kompetitive Blockade von NMDA-Rezeptoren bei gesunden Personen Psychosen auslösen können, die sich sowohl durch das Auftreten von Positiv- als auch durch Negativsymptomatik auszeichnen (Krystal et al. 1994), ist Grundlage der Glutamathypothese. Sie geht von einer Unterfunktion oder auch Instabilität des glutamatergen Systems als mögliche Ursache für Schizophrenie aus (Tsai und Coyle 2002), nachdem Kim et al. vor über 30 Jahren erstmals verminderte

Glutamatspiegel bei Schizophreniepatienten gefunden hatten (Kim et al. 1980). Andere Autoren wiesen ebenfalls Hypoaktivität im glutamatergen System von an Schizophrenie Erkrankten nach (Goff und Coyle 2001; Meador-Woodruff und Healy 2000; Olney und Farber 1995).

Eine wichtige Rolle könnte dabei eine veränderte Expression von Glutamatrezeptoren spielen, darauf deuten Untersuchungsbefunde von Gehirngewebe verstorbener schizophrener Patienten hin. So zeigte sich der AMPA Rezeptor im Gehirngewebe von an Schizophrenie Erkrankten im Bereich des Hippocampus unterexprimiert, ebenso der Kainate Rezeptor, während die Untereinheit NMDAR1 des NMDA Rezeptors in Kortikalen Regionen teilweise ungewöhnlich überexprimiert war (Meador-Woodruff und Healy 2000). Glutamat ist der häufigste exzitatorische Neurotransmitter im ZNS. Die Mehrzahl der Neurone der Großhirnrinde (Pyramidenzellen) und der Kleinhirnrinde (Körnerzellen) werden durch Glutamat erregt (Cotman et al. 1987). Glutamaterge Bahnen haben Einfluss auf das limbische System und sind auch bei der Verschaltung der Basalganglien stark beteiligt. Hier wirken u.a. die afferenten Fasern von Kortex zum Striatum über den Transmitter Glutamat erregend. Dabei sind glutamaterges und dopaminerges System allerdings eng miteinander gekoppelt. Je nach Verschaltung mit oder ohne GABAerge Neurone kann Glutamat monoaminerge Neurone hemmen oder aktivieren (Blum und Mann 2002) und so die Ausschüttung der Neurotransmitter steuern (Konradi und Heckers 2003). So kommt es bei einer Glutamat-Unterfunktion zu einer reduzierten Stimulation von inhibitierenden GABAergen Neuronen. Diese zeigen dann eine verminderte inhibitorische Aktivität und führen dadurch zu einer gesteigerten Ausschüttung von Glutamat. Die dauernde Erhöhung der Glutamatkonzentration an den Neuronen wiederum könnte zum einen neurotoxisch z.B. auf GABAerge Neurone wirken und zum anderen mesolimbisch ein hyperdopaminerges Syndrom auslösen (Konradi und Heckers 2003). Das hyperdopaminerge Syndrom generiert typische schizophrene Symptome.

Dopamin wiederum beeinflusst die Aktivität glutamaterger Neurone im Kortex und Hippocampus (Stone et al. 2007). Dass Glutamat Einfluss sowohl auf die positiven als auch die negativen Symptome der Schizophrenie ausüben kann, zeigt auch, dass schizophrene Patienten von einer Co-Medikation mit dem Glutamatagonisten D-Serin sowohl in Form einer Reduktion der Positiv- als auch der Negativsymptomatik und einer Steigerung der kognitiven Fähigkeiten profitierten (Tsai et al. 1999).

In genetischen Forschungen zur Schizophrenie haben sich unter anderem Kandidatengene wie das für Neuregulin (NRG1) (Stefansson et al. 2002) oder das für Dysbindin-1 (Straub et al. 2002) heraus kristallisiert. Dies bekräftigt die Glutamathypothese. So spielt Neuregulin eine wichtige Rolle für die neuronale Migration, für die Stabilität der Myelinscheiden sowie für synaptische Prozesse im glutamatergen System (Brinkmann et al. 2008, Falls 2003). Es gibt Hinweise, dass Dysbindin-1 an der Signaltransduktion von NMDA- und GABA-Rezeptoren beteiligt ist (Benson et al. 2001) und zudem Einfluss auf Zytoskelett und synaptische Plastizität hat (Harrison und Weinberger 2005).

Es gilt als unbestritten, dass Ungleichgewichte bzw. Störungen im Zusammenspiel der beschriebenen Neurotransmittersystemen in der Ätiologie der Schizophrenie eine entscheidende Rolle spielen. Welches der Systeme allerdings ursächlich ist, ist unklar (Stone et al. 2007). Keine der drei beschriebenen Hypothesen, weder die Serotonin-, noch die Dopamin- oder die Glutamathypothese erklärt für sich allein genommen das vielfältige Erscheinungsbild der Schizophrenie.

## **1.2 Genetik in der Schizophrenie**

Die Beteiligung genetischer Faktoren an der Entstehung der Schizophrenie wird unter allen bisher beschriebenen Risikofaktoren als der größte angesehen. Das belegt eine ganze Reihe von Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien. Welchem Vererbungsmuster die Schizophrenie folgt, ist aber noch immer unklar. Ein monogener Erbgang nach Mendelschen Regeln wurde ausgeschlossen, daher wird derzeit von einem polygenen Erbgang ausgegangen (McGue und Gottesman 1989; Bailer et al. 2002, Sullivan und Giusti-Rodriguez 2013). Das heißt, dass mehrere Gene an der Entstehung der Schizophrenie beteiligt sind, die für sich allein genommen nur ein geringes Risiko für die Krankheitsentstehung in sich bergen.

### 1.2.1 Familien-, Zwillings-, Adoptionsstudien

Die Ergebnisse von Familienstudien belegen den erheblichen Einfluss genetischer Faktoren auf das Risiko, an Schizophrenie zu erkranken. Dabei erhöht sich das Risiko umso mehr, je enger der Verwandtschaftsgrad zu einem Betroffenen ist und je mehr Familienmitglieder an Schizophrenie erkrankt sind. Tab. 1.2.1 zeigt die Ergebnisse von über 40 Studien von betroffenen, zumeist europäischen Familien, die von Gottesmann et al. ausgewertet wurden (Gottesman et. al 1991). Ähnliche Ergebnisse zeigen Studien, die Diagnossysteme wie DSM III oder IV sowie ICD 10 verwendeten (Cardno und Gottesmann 2000; Tsuang et al. 2001, Kendler et al. 1997; Kendler und Diehl 1993).

Tab. 1.2.1: Lebenszeitrisko für Schizophrenie in Abhängigkeit zum Verwandtschaftsgrad (nach Gottesmann et al. 1991)

Verwandtschaftsgrad	Gemeinsame Gene (%)	Krankheitsrisiko (%)
Normalbevölkerung	-	1 %
Verwandte 3. Grades: (Cousins/Cousinen)	12,5 %	2 %
Verwandte 2. Grades: (Enkelkinder)	25 %	5 %
Verwandte 1. Grades:		
Eltern	50 %	6 %
Geschwister	50 %	9 %
Kinder	50 %	13 %
Geschwister (1 Elternteil betroffen)	50 %	17 %
Kind (beide Eltern betroffen)	50 %	46 %
Konkordanzraten		
Dizygote Zwillinge	50 %	17 %
Monozygote Zwillinge	100 %	48 %

Zwillingsstudien lassen unter der Annahme von gleichen Umweltbedingungen Rückschlüsse auf ein genetisches Risiko für eine Erkrankung zu (Sullivan et al. 2003). Hier zeigten die Ergebnisse der Übersichtsarbeit von Gottesmann (1991) eine Kon-



kordanzrate bei dizygoten Zwillingen von 17%, bei monozygoten Zwillingen von 48% (s. Tab. 1.2.1, S. 22). Untersuchungen beruhend auf den operationalisierbaren Diagnosekriterien DSM-III (Cardno und Gottesmann 2000) ergaben geschätzte Konkordanzraten bei monozygoten Zwillingen zwischen 41% und 65%, bei dizygoten zwischen 0% und 28%. Die Werte aus den Zwillingsstudien zeigen eine unvollständige Konkordanz und sind damit Indiz für eine nicht ausschließlich genetische, sondern multifaktorielle Genese der Schizophrenie (Gottesmann und Erlenmeyer-Kimling 2001). Allerdings untermauern Adoptionsstudien die Bedeutung des genetischen Faktors im Vergleich zur Beteiligung von Umweltfaktoren. So zeigte sich, dass früh adoptierte Kinder von schizophrenen leiblichen Eltern häufiger an Schizophrenie erkrankten als früh adoptierte Kinder, deren leibliche Eltern nicht von der Krankheit betroffen waren (Kendler et al. 1994; Rosenthal und Kety 1968). Durch Analysen des Verhältnisses der Konkordanzraten kann der durch genetische Faktoren erklärbare Anteil der ätiologischen Varianz, die Heritabilität, sowie der Einfluss von Umweltfaktoren näherungsweise bestimmt werden. Dabei wird die Heritabilität der Schizophrenie zwischen 50 und 87 geschätzt (Maier et al. 1999; van Dongen und Boomsma 2013; Sullivan und Giusti-Rodriguez 2013).

### **1.2.2 Identifizierung von suszeptiblen chromosomalen Regionen**

Logische Konsequenz dieser Ergebnisse von Familien- und Zwillingsstudien ist die Suche nach genetischen Veränderungen, die im Zusammenhang mit Schizophrenie stehen könnten. Bei der Identifikation von chromosomalen Regionen oder Suszeptibilitätsgenen bei genetisch komplexen Erkrankungen wie der Schizophrenie haben bislang vor allem Kopplungs- und Assoziationsuntersuchungen Verwendung gefunden, die das Genom von Patienten auf auffällige genetische Regionen oder Marker überprüfen. Die Entwicklung der molekularbiologischen Microarray-Technik, die die parallele Analyse von mehreren hunderttausend Einzelmarkern eines Individuums erlaubt, dabei aber auch große Stichprobengrößen im zumindest vierstelligen Bereich benötigt, hat gerade in jüngster Zeit in so genannten Genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) zur Identifikation einiger vielversprechender Kandidatengene beigetragen.

### 1.2.3 Kopplungsuntersuchungen

Kopplung in genetischem Sinne bedeutet, dass eine Krankheit oder ein Phänotyp zusammen mit einem genetischen Marker überzufällig häufig gemeinsam, d.h. kosegregiert vererbt wird. Dahinter steht die Annahme, dass der genetische Marker und die krankheitsauslösende genetische Veränderung sich auf dem Chromosom in so geringem Abstand voneinander befinden, dass sie in der Meiose nicht durch Rekombination (*crossing over*) voneinander getrennt wurden (Bickeböllner und Fischer 2007). Bei den dabei untersuchten genetischen Markern handelt es sich um polymorphe DNA Sequenzen, deren chromosomale Position bekannt sein muss. Bei Kopplungsanalysen kamen dabei bisher vor allem Mikrosatelliten, auch *Short Tandem Repeats* (STRs) genannt, zum Einsatz (Murken et al. 2006). Der jeweilige Genotyp wird durch die jeweilige Länge der Wiederholungen definiert. Mittlerweile werden statt Mikrosatelliten meist Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) verwendet, die auch bei den später beschriebenen Assoziationsstudien untersucht wurden. Sie haben den Vorteil, dass sie im Genom zahlreicher vorkommen als STRs und stabiler sind als STRs, die eine sehr hohe Mutationsrate aufweisen (Fan und Chu 2007; Strachan und Read 2005).

Zielgruppen genomweiter Kopplungsuntersuchungen sind Familien mit hoher Krankheitsdichte, d.h. Familien, in denen zwei oder idealerweise noch mehr Familienmitglieder von der Krankheit betroffen sind. Dadurch ist im Gegensatz zu Fall-Kontroll-Studien eine zu große genetische Heterogenität ausgeschlossen. Allerdings besteht die Gefahr von unvollständigen oder auch falschen Ergebnissen, da sich die Auswahl auf spezifische Familien mit ihren eigenen spezifischen genetischen Variationen beschränkt (Schulze und McMahon 2002). Wenn eine Kosegregation vorliegt, also ein positiver Kopplungsbefund, ist damit eine verdächtige Region identifiziert, in deren Nähe ein Prädispositionsgen für die Erkrankung liegen könnte. Bei bekannten funktionellen Zusammenhängen zwischen einzelnen Genen und der untersuchten Krankheit kann es bei Vorliegen von Kopplungshinweisen dann durchaus sinnvoll sein, gezielt Marker aus solchen Suszeptibilitätsregionen zu untersuchen.

Im Fall von Schizophrenie ergaben sich in mehr als 20 genomweiten Kopplungsanalysen (Genomscans) wiederholt positive Kopplungsbefunde auf verschiedenen Chromosomen. Vielversprechende Ergebnisse gab es dabei zu den folgenden Regionen: 1q21–22, 1q42, 6q21–25, 8p21–22, 5q21–q33, 10p15–p11, 13q32–34, 22q11–12 (Owen et al. 2004). Dazu gehört auch die Region 6p21–p24, wo das Dys-

bindin-1-Gen lokalisiert ist, das in dieser Arbeit im Mittelpunkt der Betrachtungen steht.

In einer jüngeren Metaanalyse von 32 unabhängigen genomweiten Kopplungsstudien zur Schizophrenie konnten dagegen höchst signifikante Ergebnisse nur zu Loci auf den Chromosomenabschnitten 2q (103-134 Mbp) und 5q (142-168 Mbp) erzielt werden (Ng et al. 2009). In der Analyse derselben Forschergruppe von 22 europäischen Studien zeigten sich signifikante Kopplungshinweise auf dem Chromosomenabschnitt 8p (16-33 Mbp) (Ng et al. 2009).

### **1.2.4 Assoziationsuntersuchungen**

Assoziationsuntersuchungen sind zumeist Fall-Kontroll-Studien. Sie vergleichen die Häufigkeit des Auftretens eines oder mehrerer genetischer Marker, also Genotyp- und Allelfrequenzen oder auch Haplotypen (konstante Allel-Konstellationen benachbarter SNPs) in der Gruppe der Erkrankten mit der Gruppe der Nichterkrankten (Ziegler und König 2010). Wenn der spezifische Marker in der Gruppe der Erkrankten signifikant häufiger vorkommt als in der gesunden Kontrollgruppe, ist der jeweilige Marker, SNP oder Haplotyp mit der Erkrankung assoziiert (Bödecker und Ziegler 2000). Ein positives Assoziationsergebnis kann verschiedene Gründe haben:

1. Der untersuchte genetische Marker ist tatsächlich kausal an der Krankheitsentstehung beteiligt.
2. Der untersuchte genetische Marker trägt zwar nicht selbst zur Krankheitsentstehung bei, liegt aber in räumlicher Nähe zur ursächlichen Genveränderung und befindet sich mit ihr im Kopplungsungleichgewicht.
3. Die positive Assoziation ist zufällig und hat nichts mit der Krankheitsentstehung zu tun.
4. Unterschiede im genetischen Hintergrund bei den untersuchten Personen führen fälschlich zur Assoziation. Da sich die Allelfrequenzen in verschiedenen Ethnien unterscheiden, kann das die Ergebnisse verfälschen.

## Einleitung

Dieser Stratifikationseffekt kann aber vermieden werden, indem Patienten und Kontrollpersonen der gleichen ethnischen Gruppe abstammen.

In Assoziationsstudien kann zwischen dem funktionellen, positionellen und dem hypothesenfreien (GWAS) Ansatz unterschieden werden. Bei funktionellen Kandidatengenen handelt es sich um Gene, bei denen aufgrund ihrer Funktion eine Schlüsselrolle bei der Krankheitsentstehung vermutet wird. Im Fall der Schizophrenie kommen hier u.a. vor dem Hintergrund der Dopaminhypothese (Carlson 1978, Snyder 1976) oder der Glutamathypothese (Tsai und Coyle 2002; Kim et al. 1980). z.B. Gene für die Rezeptoren der Neurotransmitter Dopamin oder Glutamat in Frage. Positionelle Kandidatengene hingegen befinden sich in chromosomalen Regionen, die nach positiven Kopplungsbefunden Hinweise auf eine Assoziation mit Schizophrenie gezeigt haben.

Oft werden in Assoziationsstudien Einzelnukleotid-Polymorphismen, also SNPs als genetische Marker verwendet. Dabei handelt es sich um Variationen von Basenpaaren im DNA-Strang, wobei jeweils nur eine Nukleotidbase ausgetauscht ist. Etwa jede 300ste Base im menschlichen Genom ist ein SNP, damit ist er die häufigste Variation im menschlichen Genom (NCBI 2014). Von einem SNP spricht man bei einem Vorkommen von mehr als einem Prozent in der Bevölkerung (Frazer et al 2007), bei einer geringeren Frequenz handelt es sich um eine Mutation. Meist liegen SNPs in Regionen zwischen den einzelnen Genen, aber sie kommen auch innerhalb eines Gens vor. Abhängig von ihrer Lage im Gen, exonisch, intronisch oder im Bereich eines Promotors, können sie sich unmittelbar auf die Krankheitsentstehung auswirken. So könnte der SNP bei Lage in einem translatorischen Bereichs eines Exons eines Gens direkt die Genfunktion beeinflussen, wenn der Basenaustausch einen Aminosäuretausch zur Folge hat (Seyffer 2003). Die Lokalisation eines SNPs im Bereich des Promotors kann sich bei der Transkriptionsaktivität eines Gens bemerkbar machen. Eine Lokalisation im Intron kann sich auf das alternative Spleißen sowie die Expression oder Stabilität der mRNA auswirken (Mattick und Makunin 2006).

Die Erkenntnis, dass im Genom eine Haplotyp-Struktur vorliegt (Daly et al. 2001), hat vor allem die systematische Suche nach Dispositionsgenen vereinfacht. Die Haplotypblöcke ergeben sich aus nahezu konstanten Kombinationen räumlich eng beieinander liegender SNPs und verfügen über ein hohes LD, liegen also im Kopplungsungleichgewicht und werden während der Meiose nicht getrennt, sondern gemeinsam vererbt. Nach Identifizierung solcher Haplotypen ist es möglich, durch die Auswahl und Genotypisierung von relativ wenigen, so genannten *tag*SNPs oder *haplotypetag*SNPs (htSNPs) schnell und ökonomisch Assoziationen zu finden. *Tag*SNPs oder htSNPs stellen eine Unterscheidung der Haplotypblöcke sicher, bei denen es sich aber nicht um die eigentliche Suszeptibilitätsvariante handeln muss (Gabriel et al. 2002; Johnson et al. 2001). Aber auch die Haplotyp-Blockstruktur variiert bei Populationen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund, wenn auch nicht so stark wie die Allelverteilung, und hat Schwächen, wenn nur einzelne SNPs mit der Krankheit assoziiert sind (Daly et al. 2001).

Durch die systematische Untersuchung aller Gene in einem hypothesenfreien Ansatz, den genomweiten Assoziationsstudien, ist es möglich, gleichzeitigen bis zu zwei Millionen genetischer Varianten zu bestimmen (Bickeböller und Fischer 2007) und starke Assoziationen innerhalb kurzer Zeit zu entdecken. So wurde in einer aktuellen Studie das Genom von rund 37000 schizophrener Patienten im Vergleich zu rund 113000 Kontrollen detektiert (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium 2014) und dabei 108 unabhängige mit Schizophrenie assoziierte Gen-Loci entdeckt, von denen 83 vorher nicht mit Schizophrenie in Verbindung gebracht worden waren. Aber es konnten auch frühere Hypothesen gestützt werden, wie die Dopaminhypothese. So fanden die Autoren das *DRD2*-Gen mit Schizophrenie assoziiert. Das Gen für den Dopamin-Rezeptor, auf den die derzeit zugelassenen Medikamente gegen Schizophrenie abzielen (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium 2014).

Neben SNPs und Haplotypen sind in jüngster Zeit auch *Copy Number Variations* (CNV) als Marker für genetische Variationen in den Mittelpunkt gerückt (Beckmann et al. 2007). Bei CNVs handelt es sich um relativ seltene Abweichungen von der normalen Anzahl der Kopien eines bestimmten DNA-Abschnittes, zumeist Duplikationen oder Deletionen, die mehr als 1000 Basenpaare umfassen und in Verteilungsmuster

und Menge interindividuell variieren (Bartholdi 2008). Diese zwar seltenen, allerdings hoch penetranten multiplen Mutationen sind möglicherweise familienspezifisch oder spezifisch für einzelne Individuen (Mc Clellan et al. 2007) und könnten einen starken Einfluss auf die Entstehung der Schizophrenie und auch die Entwicklung eines bestimmten Phänotypen haben (Mössner et al. 2009). Welche Rolle sie genau in komplexen genetischen Erkrankungen spielen, ist aber noch ungeklärt. In einigen genomweiten Untersuchungen zeigten sich seltene CNVs in Form sowohl von Deletionen als auch von Insertionen assoziiert mit Schizophrenie (Kirov et al. 2009; Stefansson et al. 2008). Kirov sieht in ihnen einen Risikofaktor aber nicht die genetische Ursache für Schizophrenie. Denn die seltenen CNVs waren nur bei bis zu 3 Prozent der Patienten zu finden (Kirov et al. 2009).

### **1.2.5 Ergebnisse der Lokalisation von Kandidatengenen**

Nach einer Vielzahl an Kopplungs- und Assoziationsstudien, GWAS und Metaanalysen zur Genetik der Schizophrenie haben sich mittlerweile einige Prädispositionsgene für Schizophrenie herauskristallisiert (s.Tab. 1.2.2, S. 28). Doch nach wie vor gelingt es nur unvollständig, positive Studienergebnisse in Folgestudien zu replizieren (Tandon et al. 2008). Das lässt vermuten, dass keines der Gene allein für die Erkrankung ursächlich ist, sondern viele womöglich kleine Veränderungen an verschiedenen Stellen des Genoms am Ende zu einer schizophrenen Erkrankung führen. Möglicherweise sind die derzeitigen Stichprobengrößen noch immer zu gering, um ausreichend statistische Aussagekraft zu liefern (Tandon et al. 2008). Selbst bei den vielversprechendsten Kandidatengenen wie NRG1, DISC1, COMT oder DTNBP1, welches Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, und für die es bereits in zahlreichen Studien Hinweise auf eine Assoziation mit der Erkrankung gegeben hat (Harrison und Weinberger 2005), gelingt es in Folgestudien oftmals nicht, die Ergebnisse der positiv assoziierten genetischen Marker zu wiederholen (Sanders et al. 2008).

**Tab. 1.2.2: Kandidatengene nach Assoziations-, Kopplungs- oder GWAS**

<b>Gen</b>	<b>Genort</b>	<b>Untersuchung</b>
<b>RGS4</b>	1q21–22	Chowdari et al. 2002
<b>DISC1</b>	1q42	Millar et al. 2000; Ekelund 2001, Hovatta 1999
<b>ZNF804A</b>	2q31.1	O'Donovan et al. 2008
<b>CENTG2</b>	2q37.3	Shi et al. 2009
<b>DRD2</b>	11q23	(Schizophrenia Working Group 2014)
<b>DRD3</b>	3q13	Williams et al. 1998
<b>HTR4</b>	5q31–q33	Claeysen et al. 1997
<b>DTNBP 1</b>	6p22	Straub et al. 2002
<b>MHC</b>	6p21.3–22.1	(Shi et al. 2009; Stefansson et al. 2009)
<b>TRAR4</b>	6q23	Duan et al. 2004
<b>NOTCH 4</b>	6p23	Stefansson et al. 2009
<b>RELN</b>	7q22.2	Shifman et al. 2008
<b>NRG 1</b>	8p12–p21	Steffanson et al. 2002
<b>PPP3CC</b>	8p21	Gerber et al. 2003
<b>FGFR2</b> (85 kb entfernte Region)	10q25.3–q26.3	O'Donovan et al. 2009
<b>GRIA4</b>	11q22	Makino et al. 2003
<b>NRGN</b> (3,5kb entfernte Region)	11q24.2	Stefansson et al. 2009
<b>CCDC60</b>	12q24.23	Kirov et al. 2009
<b>DAO</b>	12q24	Chumakov et al. 2002
<b>5-HT-2A</b>	13q11	Inayama et al. 1996
<b>G72</b> <b>G30</b>	13q22–34	Chumakov et al. 2002
<b>AKT1</b>	14q32	Staal et al. 1988
<b>PRKCA</b>	17q23–q24	Carroll et al. 2009
<b>TCF4</b>	18q21.2	Stefansson et al. 2009
<b>PRODH</b>	22q11	Gogos et al. 1999
<b>COMT</b>	22q11	Shifman et al. 2002; Bray et al. 2003
<b>ZDHC8</b>	22q11	Mukai et al. 2004
<b>MYO18B</b>	22q11.2–q12.1	Purcell et al. 2009
<b>MIR137</b>	1p22	Ripke et al. 2011

## 1.3 Dysbindin-1 und Schizophrenie

### 1.3.1 Dysbindin-1 (DTNBP1): Gen und Protein

Das DTNBP1-Gen ist auf Chromosom 6 in der Region p22.3 lokalisiert. In dieser Region wurden starke Kopplungshinweise im Zusammenhang mit Schizophrenie gefunden (Owen et al. 2004). Wegen seiner Expression im Gehirn und der Funktion des Genprodukts im ZNS wird es als ein mögliches Kandidatengen für Schizophrenie diskutiert.

Das DTNBP1-Gen erstreckt sich über eine physikalische Länge von 140 kb und ist damit ein physikalisch sehr großes Gen. Verschiedene Transskriptvarianten kodieren für die verschiedenen Isoformen des Genprodukts, des *dystrobrevin-binding-proteine* oder Dysbindin-1 (NCBI 2014). Im Folgenden, wie auch in vielen Referenzstudien, auf die sich diese Arbeit bezieht, wird die Transskriptvariante NM\_032122 (OMIM 607145) betrachtet, die insgesamt 10 Exons beinhaltet.

Interessant ist die Nähe des DTNBP1-Gens zur der Region 6p21.3-22.1 auf dem Chromosom 6, das in GWAS starke Assoziationssignale im Hinblick auf Schizophrenie gebracht hat. Es handelt sich dabei um den Bereich um den so genannten *major histocompatibility complex* (MHC). Dabei identifizierte das *International Schizophrenia Consortium* in einer GWAS von etwa einer Million SNPs eine etwa 450 SNPs umfassende Region um den MHC, die sich mit Schizophrenie assoziiert zeigte. Zwei weitere GWAS stützen diese Ergebnisse. So zeigten sich elf SNPs in der MHC-Region mit Schizophrenie assoziiert (Shi et al. 2009; Stefansson et al. 2009).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Marker auf dem DTNBP1-Gen, rs1047631, rs2056943, rs3213207, rs1011313, rs2619522 und rs2619538 (NCBI 2014) sind von dieser Region etwas mehr als elf Megabasenpaare (Mbp) entfernt. Die genaue Lokalisation der sechs hier untersuchten SNPs zeigt Abb. 2.5. (S. 58).

Ein Zusammenhang zwischen Variationen im DTNBP1-Gen und Schizophrenie wurde erstmals von Straub et. al. beschrieben (Straub et al. 2002b). Mittlerweile ist eine Vielzahl von Untersuchungen hinzugekommen, die mehrere unterschiedliche Polymorphismen oder Haplotypen im DTNBP1-Gen identifizierten, welche eine Assoziation mit Schizophrenie gezeigt haben. Dabei waren die Ergebnisse allerdings nicht immer replizierbar und so konnten für Schizophrenie spezifische Veränderungen im DTNBP1-Gen noch nicht nachgewiesen werden (Tab. 1.3.1, S. 46).



Dysbindin-1 oder *dysbindin-binding-proteine* ist das humane Ortholog des murinen Dysbindins. Bei der Erforschung der Muskeldystrophie vom Typ Duchenne (DMD) wurde das murine Dysbindin erstmalig von Benson et al. in den Muskeln und Gehirnen von Mäusen entdeckt (Benson et al. 2001). Das Protein besteht bei der Maus aus 352 Aminosäuren, beim Menschen aus 351 Aminosäuren (Tang et al. 2009), hat ein Molekulargewicht von etwa 40 kD und enthält eine *coiled-coil*-Domäne, Leucinreiche *repeats* und einige Phosphorylierungsstellen (Van den Oord et al. 2003). Das Protein wird auch beim Menschen ubiquitär exprimiert und ist vermutlich an zahlreichen verschiedenen intra- und extrazellulären Vorgängen beteiligt. Aufgrund von Spleiß-Varianten gibt es drei verschiedene Isoformen des humanen Dysbindin-1: Dysbindin-1A, -1B und -1C. Dabei besteht das Dysbindin-1A aus 351 Aminosäuren, die Isoform 1B aus 303 Aminosäuren, hier fehlt die C-terminale Domäne, bei der Variante Dysbindin-1C fehlt die N-terminale Region vor der *coiled-coil*-Domäne, sie umfasst 270 Aminosäuren (Tang et al. 2009).

Dysbindin-1 interagiert mit den Proteinen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Dystrobrevin (DTNA, DTNB), die zum so genannten *dystrophin-associated-protein-complex* (DAPC) gehören (Benson et al. 2001). Dabei spielen die Isoformen des  $\alpha$ -Dystrobrevin die Hauptrolle im Muskelgewebe. Dort schafft der DAPC eine transmembranöse Verbindung zwischen Zytoskelett und extrazellulärer Matrix und damit ein Gerüst für die intrazelluläre Signalverarbeitung (Owen 2004b). Aber auch in der Blut-Hirn-Schranke von Säugetieren wurde  $\alpha$ -Dystrobrevin entdeckt (Bragg 2010). Neben Dysbindin-1 und Dystrobrevin besteht der DAPC aus einem Dystroglycankomplex, der ebenfalls an Dysbindin-1 bindet und Syntrophin, das über die neuronale Nitroxidsynthase (nNOS) an der intrazellulären Signalverarbeitung der Muskelzellen beteiligt ist (Jones et al. 2003). Daneben reguliert der DAPC die Calciumkonzentration in der Muskelzelle. Schädigungen des DAPC sind bei genetisch bedingten Muskelerkrankungen wie der DMD zu beobachten und gehen nicht nur mit progressiver Muskeldegeneration, sondern oftmals auch mit kognitiven Beeinträchtigungen der Patienten einher (Waite et al. 2012; Waite et al. 2009; Lovering 2005; Anderson 2000). Das lässt darauf schließen, dass Dysbindin auch im Gehirn eine Rolle spielt. Da die Isoform DTNB nur in postsynaptischen Bereichen von Neuronen des ZNS zu finden ist, unterscheidet sich der DAPC offenbar im Muskel und im ZNS voneinander (Pilgram et al. 2010; Blake et al. 1999).

### 1.3.2 DTNBP1 im Gehirn

Dysbindin-1 wird im menschlichen Gehirn an zahlreichen Stellen exprimiert, wie in der Hippocampusfraktion (HF), bestehend aus Hippocampus proper, Gyrus dentatus und Subiculum (Scharfman et al. 2000), dem prä- und temporalen Cortex, im Thalamus, Mittelhirn, Amygdala, Caudatum, Putamen und Nuclueus accumbens (Weickert et al. 2004). Auf Zellebene wurde dabei die Expression von Dysbindin-1 in Neuronen und Gliazellen festgestellt (Benson et al. 2001). Talbot et al. fanden Dysbindin-1 in wichtigen neuronalen Zellpopulationen der HF, wie Pyramidenzellen, Körnerzellen, und polymorphen Zellen, vor allem aber in den Endigungen von glutamatergen Neuronen (Talbot et al. 2004). Untersuchungen schizophrener Patienten ergaben, dass die Expression von Dysbindin-1 in der HF, hier vor allem in der inneren molekularen Schicht des Gyrus dentatus, sowie dem präfrontalen Cortex auffällig vermindert ist (Talbot et al. 2004; Weickert et al. 2004; Weickert et al. 2008), Regionen also, die eng mit der psychotischen Symptomatik in Verbindung gebracht werden. Dysbindin-1 war in den Untersuchungen präsynaptisch vor allem an den terminalen Endigungen von glutamatergen Neuronen zu finden und dort bei schizophrenen Patienten auch signifikant vermindert im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Die präsynaptische Verminderung war dabei unabhängig von DAPC und DTNB (Talbot et al. 2004). In anderen Gehirnarealen wie dem Cortex cingularis anterior war keine Reduktion von Dysbindin-1 festzustellen (Talbot et al. 2004). Auffällig bei den Ergebnissen von Talbot et al. ist, dass die oben beschriebene Verminderung von Dysbindin-1 in der inneren molekularen Schicht des Gyrus dentatus invers mit der Konzentration von VGluT-1, einem vesikulären Glutamat-Transporter, korrelierte.

In vivo-Messungen mittels Protonen Magnetresonanz Spektroskopie (MRS) zeigten, dass die hippocampale Glutamatkonzentration von Genvarianten im DTNBP-1-Gen beeinflusst wird (Wirth et al. 2012). Die Ergebnisse von Chen et al. (2008) zur Neurosekretion und Vesikel-Morphologie neuroendokriner Zellen und hippocampaler Synapsen des Nagetiers *sandy mouse*, die aufgrund einer Deletion im Dysbindin-Gen kein Dysbindin exprimieren kann (Li et al. 2003), zeigten Veränderungen an den Vesikeln, wie die Verkleinerung des Vesikelpools bei gleichzeitig vergrößerten Vesikeln, verminderte Abgabefähigkeiten sowie insgesamt langsamere Abgabe von Inhalten der Vesikel im synaptischen Spalt (Chen et al. 2008). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Dysbindin-1 auch bei der Regulation der Exozytose und Vesi-

kel-Biogenese endokriner Zellen und Neuronen eine wichtige Rolle spielen könnte (Chen et al. 2008).

Tang et al. untersuchten das Vorkommen der drei verschiedenen Spleiß-Varianten von Dysbindin-1 in menschlichen Gehirnen verstorbener schizophrener Patienten. Dabei zeigte sich, dass, unabhängig von der mRNA-Expression im Gewebe, im Bereich des dorsolateralen präfrontalen Cortex die Isoform Dysbindin-1C im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant vermindert ist, nicht aber die Isoformen 1A oder 1B (Tang et al. 2009). Die Isoformen finden sich in verschiedenen Bereichen des menschlichen Gehirns in den Synaptosomen an den synaptischen Enden der Neurone (Talbot et al. 2011). Dabei ist Dysbindin-1A fast ausschließlich in der postsynaptischen Membran des Neurons lokalisiert, in den so genannten *postsynaptic densities* (PSD). Die PSD sind spezielle Proteinkomplexe im Zytoskelett an der synaptischen Verbindung zweier Neurone, wo sich unter anderem auch der glutamaterge NMDA-Rezeptor befindet (Kennedy 1997). Sie liegen in der postsynaptischen Membran, in unmittelbarer Nähe der aktiven Zone zwischen prä- und postsynaptischer Endigung und den andockten synaptischen Vesikeln. Die PSD sind mitverantwortlich für ein funktionierendes Zusammenspiel zwischen Rezeptoren und Neurotransmitterabgabe (Kennedy 2000; Sheng und Kim 1996). Die Isoform Dysbindin-1B ist fast ausschließlich mit den synaptischen Vesikeln assoziiert, Dysbindin-1C findet man teilweise assoziiert mit synaptischen Vesikeln, zum größeren Teil aber in postsynaptischer Verbindung mit den PSD (Louneva et al. 2007). Die von Tang et al. festgestellten Dysbindin-1C-Verminderungen im dorsolateralen präfrontalen Kortex lassen vermuten, dass ein verminderter Dysbindin-1C-Level in dieser Gehirnregion möglicherweise über eine Beeinflussung des NMDA-Rezeptors in Neuronen an kognitiven Defiziten bei Schizophrenen mitverantwortlich sein könnte (Tang et al. 2009). Dafür sprechen auch die festgestellten postsynaptischen Effekte der mangelnden Expression von Dysbindin-1 bei Nagetieren wie der *sandy mouse* (Feng et al. 2008). Die Mäuse zeigen Schizophrenie-ähnliche Verhaltensweisen wie sozialer Rückzug und kognitive Defizite. Feng et al. stellten im Hippocampus der Mäuse aufgrund des Fehlens von Dysbindin-1 auch eine Verminderung von snapin fest, das für das Andocken und die Fusion von Vesikeln nötig ist (Feng et al. 2008).

Gemeinsam mit snapin ist Dysbindin-1 auch ein essentieller Bestandteil der Biogenese des *lysosome-related organelles complex 1* (BLOC1) und agiert mit allen sieben anderen seiner Komponenten (Li et al 2003). BLOC-1 beinhaltet neben Dysbin-

din-1 und snapin auch die Proteine pallidin, muted, cappuccino, BLOS1, BLOS2, BLOS3. Neben einer Verminderung an Dysbindin-1 in der innermolekularen Schicht des Gyrus dentatus bei schizophrenen Patienten (Talbot et al. 2004) wurden hier auch reduzierte Level an pallidin, snapin und besonders BLOS3 festgestellt, während in den Untersuchungen der HF der *sandy mouse* das Protein pallidin vermindert war (Mullin et al. 2011). BLOC-1 ist am Transport der Vesikel zu den *lysosome-related organelles* beteiligt. Eine Defizienz des BLOC-1-Komplexes verursacht das Hermansky-Pudlak-Syndrom bei Mäusen. Auch beim Menschen stehen Fehlfunktionen von BLOC-1 und Mutationen im Dysbindin-1-Gen im Verdacht, für die Krankheit mit verantwortlich zu sein (Li et al. 2003).

Talbot et al. stellten zudem fest, dass erniedrigte Konzentrationen an präsynaptischem Dysbindin-1 im Gyrus dentatus invers mit der Menge des vesikulären Glutamattransporters (VGLUT-1) korrelieren (Talbot et al. 2004), der vor allem in der HF exprimiert wird. Das bekräftigt die Vermutung, dass Dysbindin-1 möglicherweise über eine Beeinflussung des Glutamatstoffwechsels eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Schizophrenie zukommen könnte. In einer späteren Untersuchung (Talbot et al. 2011) stellten die Autoren signifikant verminderte Konzentrationen der Isoform Dysbindin-1A im assoziativen Hörkortex im Bereich des posterioren superioren Gyrus temporalis bei schizophrenen Patienten fest. Dagegen fanden sich in der HF von schizophrenen Patienten normale Level von Dysbindin-1A bei deutlich reduzierten Konzentrationen an Dysbindin-1B und -1C. Die Autoren folgerten dass der Mangel an Dysbindin in der jeweiligen Isoform postsynaptisch die Oberfläche von Nervenzellen schädigt und so zu Störungen in der Verarbeitung von akustischen Informationen und Defiziten im Arbeitsgedächtnis führen könnte (Talbot et al. 2011), die typisch für die Symptomatik der Schizophrenie sind. Der Einfluss von Dysbindin auf den Glutamatstoffwechsels wird auch von den Arbeiten an Zellen kortikaler Ratten-Neurone von Numakawa et al. (2004) gestützt. Sie zeigten, dass eine Überexpression von Dysbindin-1 den extrazellulären basalen Level von Glutamat erhöht, wobei die Ausschüttung von Glutamat von hohen Kaliumspiegeln getriggert wurde. Zudem stieg die Konzentration der präsynaptischen Proteine SNAP25 und Synapsin I, die bei der Exozytose von Neurotransmittern von Bedeutung sind (Numakawa et al. 2004). Das lässt darauf schließen, dass Dysbindin-1 die Exozytose und damit die Abgabe von Glutamat über die Hochregulierung von präsynaptisch beteiligten Stoffen beeinflussen kann.

Möglicherweise ist Dysbindin-1 auch ein protektiver Faktor, schützt Zellen vor Stress und hilft Neuronen beim Überleben. Denn in der Untersuchung von Numakawa et al. (2004) zeigten sich bei Überexpression von Dysbindin-1 im Zellkultursystem auch erhöhte Konzentrationen des Proteins Akt1. Dieses Protein ist durch Phosphatidylinositol-3-Kinase aktivierbar und schützte die korticalen Neurone in der Zellkultur vor durch Serummangel bedingtem Stress und Zelluntergang (Numakawa et al. 2004). Auch Dickman und Davis identifizierten Dysbindin-1 als wichtigen Einflussfaktor für die Neuroplastizität und Modulation der Neurotransmission an den Synapsen und stellten eine Abhängigkeit der Funktion von Dysbindin-1 mit dem Calciumeinstrom fest (Dickman und Davis 2009).

Die Ergebnisse von Shao und Kollegen zeigten, dass allein die Manipulation des DTNBP-1-Gens Einfluss sowohl auf das glutamaterge als auch das dopaminerge System hat. Sie untersuchten Gehirnzellen der Fruchtfliege *Drosophila*. Die Expression von Dysbindin-1 bei der *Drosophila* ist sehr ähnlich zu der im menschlichen Gehirn und dem von Wirbeltieren. Bereits bei einer lediglich 40prozentigen Abwesenheit von Dysbindin-1 kam es bei der Fruchtfliege zu ähnlichen Phänotypen wie bei der *sandy mouse*. So wurde eine verminderte glutamaterge Transmission beobachtet bei gleichzeitig erhöhter dopaminerger Aktivität (Shao et al. 2011). Dabei identifizierten Shao et al. zwei verschiedene, voneinander unabhängige Mechanismen. Einerseits hatte die verminderte Expression von *Drosophila* Dysbindin in präsynaptischen Neuronen eine signifikante Suppression der Übertragung an glutamatergen Synapsen zur Folge, was für die beobachtete Verschlechterung der Gedächtnisfunktionen verantwortlich gemacht wurde. Auf der anderen Seite führte die verringerte Expression von *Drosophila* Dysbindin in glialen Zellen zu hyperdopaminergen Aktivitäten wie Bewegungsstörungen und Veränderungen im Paarungsverhalten. Diesen Effekt ordneten die Forscher der beobachteten verminderten Expression des Enzyms *Ebony* in glialen Zellen zu, das bei der Regulation des Dopaminkreislaufs eine wichtige Rolle spielt (Shao et al. 2011). Die Störungen in beiden Systemen konnten aber wieder rückgängig gemacht werden, indem die Expression von Dysbindin erhöht wurde. War im Bereich der Neuronen wieder ausreichend Dysbindin vorhanden, normalisierten sich sowohl glutamaterge Aktivität als auch die kognitiven Leistungen. Ausreichende Dysbindin-Expression im Bereich der Glia wiederum normalisierte Paarungsverhalten und Bewegungsfähigkeit, und zwar unabhängig davon, ob es sich um *Drosophila*

Dysbindin handelte oder um humanes Dysbindin-1, das zu 28% aminosäureidentisch mit dem der Fruchtfliegen ist (Shao et al. 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Dysbindin-1 sowohl bei der glutamatergen Transmission als auch der stressinduzierten Überlebenseigenschaft von Neuronen eine wichtige Rolle zu spielen scheint.

Die Beobachtung, dass DTNBP1 bei schizophrenen Patienten vor allem in der HF vermindert ist, die bei der Verarbeitung sensorischer Afferenzen von großer Bedeutung ist, könnte die bei der Schizophrenie bekannten kognitiven Defizite über eine Beeinflussung des exzitatorischen, glutamatergen Signalweges erklären.

Zudem übt Dysbindin-1 im ZNS über die Expression in Gliazellen Einfluss auf das dopaminerge System aus, was ebenfalls zu schizophrenietypischen Befunden wie Antriebs- oder Bewegungsstörungen, aber auch Positiv-Symptomen führen könnte. Damit stützen die aktuellen Forschungsergebnisse zu Dysbindin-1 sowohl die Glutamat- als auch die Dopaminhypothese der Schizophrenie und die Vermutung, dass dem Protein in der Pathogenese der Schizophrenie eine wichtige Rolle zukommen könnte.

### 1.3.3 Assoziationsuntersuchungen am DTNBP1-Gen

#### **Straub et al. 2002:**

In einer familienbasierten Assoziationsstudie einer irischen Population mit 270 Familien, in denen Schizophrenie mit einer hohen Dichte aufgetreten war (*ISHDSF-Sample*) und insgesamt 1425 Personen, wurden insgesamt 17 SNPs untersucht (Straub et al. 2002b). Diese waren in der Region des Chromosoms 6 lokalisiert, die zuvor stärkste Kopplungshinweise in Bezug auf Schizophrenie gezeigt hatte (Straub et al. 2002a) und in der sich auch das DTNBP1-Gen befindet. 12 SNPs lagen dabei innerhalb des DTNBP1-Gens, 5 SNPs in unmittelbarer Nähe. Bei allen Markern handelte es sich um intronische SNPs, mit Ausnahme von rs742106, der im nicht-codierenden Bereich eines Exons in der 3'-UTR lokalisiert ist. Bei der Auswahl der Patientengruppe wurde nach DSM-III-Kriterien entschieden. Das gesamte Patientenkollektiv wurde nach Familienanamnese in vier Gruppen unterteilt. Dabei umfasste

die Gruppe D1-D2 625 schizophrene oder schizoaffektive Patienten (davon wurden 565 genotypisiert) ohne Bezug zur Familienanamnese. In der Gruppe D1-D5 wurden 804 schizophrene Patienten mit Angehörigen, die unter einer nicht näher spezifizierten psychiatrischen Erkrankung litten zusammengefasst, analog der Gruppe 2 in der vorliegenden Arbeit. Davon wurden 691 genotypisiert. Die Gruppe D1-D8 umfasste 888 schizophrene Patienten mit schizophrenen Angehörigen (744 wurden genotypisiert), analog der hier verwendeten Gruppe 3 und Gruppe D1-D9 enthielt 1172 Patienten (952 wurden genotypisiert), die unter psychischen Erkrankungen litten, aber nicht zwingend unter Schizophrenie.

Folgende SNPs zeigten eine signifikante Assoziation mit Schizophrenie: rs742105 in den Gruppen D1-D5 und D1-D8, rs2619539 in allen vier Gruppen, rs32113207 (G-Allel) in allen vier Gruppen, rs1011313 (G-Allel) nur in den Gruppen D1-D5, D1-D8 und D1-D9, rs2619528 in der Gruppe D1-D5, rs2005976 in der Gruppe D1-D5, rs760761 in der Gruppe D1-D2 und D1-D5. Die stärksten Assoziationen zeigten die Marker rs32113207 mit einem p-Wert von 0,00009 in der Gruppe D1-D2 und 0,00004 in der Gruppe D1-D8.

Die Marker rs909706, rs1018381, sowie rs2619522 zeigten keine signifikante Assoziation mit der Schizophrenie (Straub et al. 2002b).

Bei der engeren Betrachtung von jeweils nur einem von Schizophrenie betroffenen Nachkommen einer Kernfamilie eines Stammbaums, zeigten weiter drei SNPs Hinweise auf Assoziation (rs2619522, rs2005976, rs2619528). Am auffälligsten war dabei der Marker rs2005976 mit einem p-Wert von 0,0078.

Bei Haplotyp-Analyse waren zahlreiche 3-Marker-Haplotypen signifikant (Straub et al. 2002b). Die stärksten Assoziationen zeigten die drei folgenden SNP-Kombinationen:

rs32113207 - rs1011313 - rs2619528 (p-Wert: 0,0006)

rs1011313 - rs2619528 - rs2005976 (p-Wert: 0,0001)

rs2619528 - rs2005976 - rs760761 (p-Wert: 0,0001)

### **Van den Oord et al. 2003**

Die selbe Arbeitsgruppe identifizierte im selben Kollektiv bei einer erneuten Untersuchung von 268 Familien und insgesamt 2368 Personen die nah beieinander liegenden SNPs rs760761, rs2005976 und rs32113207 (G-Allel) in der Haplotyp-Analyse als signifikant mit Schizophrenie assoziiert. Zwischen den SNPs rs32113207 und

rs1474605 wurde eine, aus acht benachbarten SNPs bestehende, verdächtige Haplotyp-Blockstruktur gefunden (s. Tab. 1.3.1, S.46) und schließlich ein Risikohaplotyp ausgemacht. Dieser wurde am häufigsten innerhalb der Familien an die Patienten weiter gegeben und wurde von den Autoren der Studie mit einer zunehmenden kognitiven Verschlechterung während der Erkrankung in Verbindung gebracht. Der Haplotyp trat allerdings insgesamt nur mit einer relativ geringen Frequenz von etwa 6% auf und wurde bei den jeweiligen SNPs zumeist durch das seltenere Allel markiert (Van den Oord et al. 2003).

### **Schwab et al. 2003**

SNPs, zu denen es zum Teil bei Straub et al. positive Assoziationsergebnisse gegeben hatte, wurden in dieser Studie erneut untersucht. Das Kollektiv deutscher, israelischer und ungarischer Herkunft bestand aus 78 Geschwisterpaar(Sib-Pair)-Familien und 125 Trios. In der Einzel-SNP-Untersuchung zeigten sich fünf der sechs untersuchten Polymorphismen signifikant mit Schizophrenie assoziiert, darunter wie bei Straub die Marker rs32113207 (G-Allel), rs2619528, rs760761 und rs1011313 (G-Allel), aber auch der Marker rs2619522 (T-Allel). Die stärkste Assoziation zeigte der Marker rs760761 mit einem p-Wert von 0,0007 (Schwab et al. 2003).

Bei der Haplotyp-Analyse ergaben sich die stärksten Hinweise auf eine Assoziation bei Kombinationen mit dem Marker rs1011313. Der Risikohaplotyp war, im Unterschied zu den Ergebnissen von Straub und van den Oord, durch eine hohe Auftretsfrequenz gekennzeichnet. Dabei fand sich an den Loci zumeist das jeweils häufigere Allel. Auch in der Einzel-SNP-Analyse war das hier der Fall gewesen, im Gegensatz zu den Ergebnissen von Straub bei der irischen Population. Das lässt darauf schließen, dass sich Risikohaplotypen innerhalb unterschiedlicher Populationen unterscheiden, da sie wahrscheinlich evolutionär bedingt sind. Daher könnten natürlich auch die genetischen Risiken für Schizophrenie von Population zu Population unterschiedlich sein (Schwab et al. 2003).

### **Williams et al. 2004**

Nachdem es der Forschergruppe um Morris an einem irischen Kollektiv von 219 Patienten und 231 Kontrollen nicht gelungen war, bei insgesamt acht Markern, die zuvor zum Teil auch bei Straub analysiert worden waren, einen Hinweis auf Assoziation zu finden (Morris et al. 2003), untersuchte die Gruppe um Williams dieses Dublin-Kollektiv erneut (Williams et al. 2004) und zusätzlich noch ein britisches Kollektiv, die



Cardiff-Stichprobe, bestehend aus 708 schizophrenen Patienten und 711 Kontrollen. Insgesamt 20 SNPs wurden betrachtet, darunter vier, bei denen es zuvor bei Straub positive Assoziationsergebnisse gegeben hatte, doch keines davon konnte sowohl beim Cardiff- als auch beim Dublin-Kollektiv repliziert werden. Einer der hier erstmals untersuchten SNPs, der Marker rs2619538 (T-Allel) zeigte mit einem p-Wert von 0,06 einen Trend zur Assoziation. Beim Marker rs1047631 hingegen ergab sich keinerlei Assoziationshinweis (Williams et al. 2004).

In der folgenden Haplotyp-Analyse zeigte die Marker-Kombination rs2619539-rs3213207-rs2619638 Signifikanz. Bestehend aus den Allelen C-A-A wurde sie als protektiver Haplotyp interpretiert, da sie bei den gesunden Kontrollen sowohl im Cardiff- als auch im Dublin-Kollektiv signifikant häufiger zu finden war. Dagegen wurde sie, bestehend aus den Allelen C-A-T, als Risikohaplotyp identifiziert, da sie in beiden Stichproben signifikant häufiger bei den schizophrenen Patienten vorgekommen war.

### **Kirov et al. 2004**

Auch Kirov et al. versuchten in einer familienbasierten Studie die Ergebnisse von Straub et al. zu replizieren an 488 bulgarischen Trios mit jeweils einem an Schizophrenie erkrankten Indexpatienten. Bei der Einzelmarkeruntersuchung von insgesamt acht SNPs fanden sie die Marker rs3213207 (A-Allel) und rs2005976 signifikant mit der Erkrankung assoziiert. In der Haplotypanalyse zeigte sich hohe Signifikanz für den vier-Marker-Haplotyp rs2619539-rs3213207-rs1011313-rs2005976 mit einem p-Wert von 0,0007 (Kirov et al 2004).

### **Van den Bogaert et al. 2003**

Hier wurden mit den Markern rs3213207, rs1011313, rs2005976, rs760761 und rs1018381 fünf der zuvor von Straub et al. getesteten SNPs exploriert. Die SNPs wurden an einem deutschen Kollektiv von 418 schizophrenen Patienten und 113 Kontrollen, einem polnischen Kollektiv von 294 Patienten und 113 Kontrollen sowie einem schwedischen Kollektiv von 142 schizophrenen Patienten und 272 Kontrollen untersucht. Für die Diagnose wurden DSM-IV-Kriterien verwendet. Ein signifikanter Assoziationshinweis ergab sich lediglich bei einem einzigen Marker. In der schwedischen Gruppe konnte beim SNP rs1011313 (G-Allel) ein p-Wert von 0,032 errechnet werden. In einer zweiten Analyse wurde eine Patientengruppe selektiert, die eine positive Familienanamnese i.S. von zumindest einem Verwandten ersten oder zwei-

ten Grades mit Schizophrenie aufwies. Hier zeigten sich zunächst die SNPs rs2005976 und rs1018381 auffällig, die allerdings nach Korrekturen das Signifikanzniveau nicht mehr erreichten.

Bei der Analyse der Haplotypen der Patientengruppe mit positiver Familienanamnese wurde ein Haplotyp bestehend aus den fünf Markern rs3213207-rs1011313-rs2005976-rs760761-rs1018381 als signifikant mit Schizophrenie assoziiert identifiziert, mit einem p-Wert von 0,00009.

### **Tang et al. 2003 / Numakawa et al. 2004**

Auch in asiatischen Kollektiven wurden signifikante Assoziationen zwischen Polymorphismen auf dem DTNBP1-Gen und Schizophrenie festgestellt. So identifizierten Tang et al. in ihrer familienbasierten Untersuchung von sieben SNPs, die auch bei Straub et al. analysiert worden waren, in 233 chinesischen Trios den hochsignifikanten Risikohaplotypen: rs2619539–rs2919522–rs1018381–rs909706 und die Allel-Kombination G-T-C-A, die bei schizophrenen Patienten übermäßig häufig übertragen wurde. Der p-Wert von 0,00091 zeigte ein hohes Signifikanzniveau (Tang et al. 2003). Dieser Risikohaplotyp wurde in europäischen Kollektiven bisher nicht identifiziert, was erneut dafür spricht, dass der genetische Hintergrund unterschiedlicher Populationen wie der chinesischen und der europäischen Populationen offenbar differiert (Tang et al. 2003) und dies Einfluss auf die Ätiologie einer Erkrankung an Schizophrenie ausübt.

Numakawa et al. untersuchten ein japanisches Kollektiv aus 670 schizophrenen Patienten und 588 Kontrollen. Bei der Analyse von insgesamt sechs SNPs zeigten sich signifikante Assoziationen bei den Markern rs2619538 (A-Allel), rs3213207 (G-Allel), rs760761 (T-Allel) und rs2619522 (G-Allel), die mit einem p-Wert von 0,0013 bei dem SNP rs3213207 am deutlichsten ausfiel (Numakawa et al. 2004). Die Marker rs2619539 und rs1011313 zeigten bei der Einzel-SNP-Untersuchung zwar keine Assoziation, waren aber teils in der Haplotypanalyse auffällig. So identifizierten die Autoren einen Risikohaplotypen mit der Kombination rs3213207–rs1011313 mit den Allelen G-G und einem p-Wert von 0,0042 (Numakawa et al. 2004).

### **Funke et al. 2004**

Drei Kollektive unterschiedlicher ethnischer Herkunft, kaukasisch, afroamerikanisch und hispanisch, standen hier im Mittelpunkt der Untersuchung. Funke et al. versuchten die Ergebnisse von Straub et al. von sechs SNPs zu replizieren.

Bei der kaukasischen Untersuchungsgruppe handelte es sich um 258 Patienten mit Schizophrenie und schizophrenieformer Störung und 467 Kontrollen, bei der afroamerikanischen um 215 Fälle und 74 Kontrollen und bei der hispanischen Gruppe um 51 Patienten und 32 Kontrollen. Im kaukasischen und hispanischen Kollektiv zeigte sich Signifikanz bei den Markern rs10118381, rs2619522, rs2619528 und rs760761. Dabei zeigte bei den Kaukasiern der Marker rs10118381 die stärkste Assoziation mit einem p-Wert von 0,0026 und bei den Hispaniern der Marker rs2619528 mit einem p-Wert von 0,017. Dagegen war im afroamerikanischen Kollektiv keiner der untersuchten Einzelmarker signifikant mit Schizophrenie oder einer schizophrenen Störung assoziiert (Funke et al. 2004).

Bei der Haplotypanalyse zeigte sich in der kaukasischen Gruppe eine Signifikanz mit einem p-Wert von 0,005 bei einem Risikohaplotyp aus insgesamt sechs Markern: rs909706–rs10118381–rs2619522–rs760761–rs2619528–rs1011313 und der Allelkombination G-T-G-T-A-G (Funke et al. 2004).

### **Li et al. 2005**

Li et al. genotypisierten insgesamt 10 SNPs, die bereits in vorherigen Studien Gegenstand der Betrachtung waren, in einer familienbasierten Untersuchung an einem Kollektiv von 638 hanchinesischen Trios. Einer der Marker, rs2619538, lag bei der hanchinesischen Population nicht im HWE und wurde daher ausgeschlossen. Zwei SNPs, rs3213207 (A-Allel, p-Wert=0,02) und rs2619528 (G-Allel, p-Wert=0,002), zeigten sich signifikant mit Schizophrenie assoziiert, allerdings mit genau gegensätzlichen Allelen im Vergleich zu den Ergebnissen der Studien von Straub (2002) und Van der Oord (2003). Li et al. sahen hier einen erneuten Hinweis für den Einfluss genetischer Unterschiede verschiedener Ethnien auf die Ätiopathogenese der Schizophrenie (Li et al. 2005). Die von Li et al. gefundenen Marker waren zuvor bei der Analyse chinesischer Trios von Tang et al. nicht untersucht worden.

In der Haplotyp-Analyse zeigte sich in der Gruppe der Hanchinesen die Kombination der SNPs rs2005976 und rs2619528 bestehend aus den häufigeren Allelen G-G mit einem p-Wert von 0.000005 mit Schizophrenie assoziiert.

In einer zweiten Gruppe analysierten Li et al. 580 schottische schizophrene Patienten und 620 Kontrollen. Im schottischen Kollektiv zeigte sich keiner der Einzelmarker signifikant mit Schizophrenie assoziiert. Der Haplotyp, bestehend aus rs760761-rs2005976 und der Allelkombination C-G zeigte sich hier mit einem p-Wert von 0,0006 signifikant (Li et al. 2005).

### **De Luca et al. 2005**

Hintergrund der Untersuchung von De Luca et al. (2005) waren die Ergebnisse der zuvor durchgeführten Arbeit von Bray et al. (2005). Bray et al. waren bei der allelspezifischen Expressionsanalyse des SNPs rs1047631 an post mortem Hirngewebe sehr gemischter Kollektive von Personen mit unterschiedlichen, teilweise auch ohne neuropsychiatrische Erkrankungen auf Hinweise auf eine verminderte Expression der DTNBP1 mRNA gestoßen, die das A-Allel des SNPs 1047631 enthielt. Dabei zeigte das häufigere A-Allel eine deutlich signifikante ( $p < 0,0001$ ) Reduktion in der Expression im Vergleich zum G-Allel (Bray et al. 2005). Daraufhin führten De Luca et al. eine Assoziationsuntersuchung sowohl am SNP rs1047631 durch, der am 3'-Ende des DTNBP-1-Gens liegt, als auch bei zwei anderen Markern, rs742106 sowie rs909706, im Bereich der 5'-UTR. Das untersuchte Kollektiv bestand aus 117 von Schizophrenie betroffenen Familien. Dabei waren 106 Familien kaukasischer, zwei afrikanischer und neun asiatischer Abstammung. Für keinen der drei Marker fanden sich Hinweise auf Assoziation mit Schizophrenie (De Luca 2005).

### **Duan et al. 2007**

In der Analyse von Duan et al. hingegen zeigten sich Assoziationshinweise am 3'-Ende des Gens. An 136 Familien und 646 Individuen mit der Diagnose Schizophrenie oder schizoaffektiver Störung, die zu 72% europäischer und zu 18% afroamerikanischer und zu 10% unbekannter Abstammung waren, wurden insgesamt 26 SNPs genotypisiert. Darunter waren neun SNPs, die in den Vorgängerstudien untersucht worden waren und Assoziationshinweise mit Schizophrenie geliefert hatten. Um das DTNBP-1-Gen umfassend abzudecken, wurden zusätzlich 17 weitere Marker analysiert, darunter sieben SNPs, die in kodierenden Regionen des Gens lokalisiert sind. Von diesen sieben SNPs zeigte keiner einen Hinweis auf Assoziation mit Schizophrenie, genau wie für die neun SNPs aus den Vorläuferstudien. Dagegen zeigten sich drei Marker, die am 3'-Ende des Gens in enger Beziehung zueinander stehen,

rs875462, rs760666 und rs7758659 mit einem p-Wert von 0,004 sowohl im europäischen als auch im afroamerikanischen Sample signifikant mit Schizophrenie assoziiert (Duan et al. 2007). Der signifikanteste Haplotyp war rs7758659-rs3213207 mit einem p-Wert von 0,0015. Dabei handelt es sich bei dem beteiligten SNP rs3213207 um den Marker, der bislang mit am häufigsten als signifikant mit Schizophrenie assoziiert beschrieben worden ist. Zudem kam die Missense-Variante (Pro272Ser) in der 3'-Region des DTNBP-1-Gens bei den schizophrenen Patienten häufiger vor als bei den Kontrollen, allerdings nicht statistisch signifikant (Duan et al. 2007).

### **Tosato et al. 2007**

Insgesamt 80 schizophrene Patienten und 106 gesunde Kontrollen wurden genotypisiert. Ziel war nicht nur, Assoziationen einzelner SNPs oder Haplotypen mit Schizophrenie zu finden, sondern auch einen möglichen Zusammenhang zwischen genetischen Variationen und Schwere der Symptomatik. So wurde getestet, ob Träger von Risikohaplotypen retrospektiv eine ungünstigere Krankheitsentwicklung zeigten. Bei der Einzel-SNP-Untersuchung zeigte nur der Marker rs2619538 einen Trend zur Assoziation mit Schizophrenie bei einem p-Wert von 0,058. Es konnten bei den Patienten drei Risikohaplotypen identifiziert werden. Dabei zeigte die Kombination rs760761-rs2005976 mit einem p-Wert von 0,034 den stärksten Assoziationshinweis. Für die Kombination rs2619538-rs909706-rs1018381 wurde ein p-Wert von 0,040 errechnet. Der Haplotyp rs2619538-rs909706 ( $p=0,048$ ) zeigte sich auffällig häufiger bei Patienten mit schwerer und persistierender Psychopathologie.

### **Peters et al. 2008**

Insgesamt 39 *tag*-SNPs wurden an einem anglo-irischen Kollektiv von 336 Patienten und 172 Kontrollen genotypisiert. Eingeschlossen wurden Patienten, die klinisch und aufgrund ihrer neurokognitiven Symptomatik als schizophren eingeordnet wurden, ohne dabei DSM-Kriterien anzulegen. Unter anderem wurde der zuvor nur wenig beachtete Marker rs2056943 analysiert. Jedoch zeigte kein einziger der von Peters et al. untersuchten Einzelmarker oder Haplotypen einen Hinweis auf Assoziation.

### **Sanders et al. 2008**

In einer Assoziationsstudie wurden 789 SNPs auf 14 Kandidatengenen genotypisiert, darunter auch das DTNBP1-Gen. Dabei waren auch SNPs, die sich in Studien zuvor

mit Schizophrenie assoziiert gezeigt hatten. Das untersuchte Kollektiv umfasste 1870 Patienten europäischen Ursprungs mit Schizophrenie oder schizoaffektiver Störung nach DSM-IV und 2001 gesunde Kontrollpersonen. Keiner der untersuchten Marker zeigte einen Hinweis auf Assoziation mit Schizophrenie. Eine zweite Berechnung unter Ausschluss von Patienten mit schizoaffektiver Störung änderte die Resultate nicht. Die Autoren halten es aufgrund ihrer Ergebnisse für unwahrscheinlich, dass Polymorphismen in den untersuchten Genen einen großen Einfluss auf das genetische Risiko, an Schizophrenie zu erkranken, haben. Kleine Effekte schließen sie nicht aus (Sanders et. al 2008).

### **Dutt et al. 2009**

Im Zuge einer morphometrischen Endophänotypenstudie wurden 128 Patienten mit Schizophrenie, 194 ihrer nicht schizophrenen Verwandten sowie 61 gesunde Kontrollpersonen via Magnetresonanztomografie auf morphologische Veränderungen im Gehirn untersucht. Gleichzeitig wurde eine genetische Analyse im Bereich mehrerer Kandidatengene, darunter auch DTNBP1, vorgenommen. Bei der Untersuchung genetischer Marker, darunter auch die SNPs rs2056943 und rs1047631, fand sich kein Hinweis auf Assoziation zwischen regionalen Veränderungen von Gehirnvolumina und den untersuchten genetischen Polymorphismen.

### **Riley et al. 2009**

In einem irischen Kollektiv von 1021 Patienten mit Schizophrenie oder schwerer schizoaffektiver Störung und 626 Kontrollen wurden in dieser Assoziationsstudie neun SNPs genotypisiert, um die Ergebnisse früherer Studien irischer Kollektive (Van den Oord et al. 2003; Williams et al. 2004) zu replizieren. 196 Patienten wiesen Fälle von Schizophrenie oder Psychosen bei Verwandten ersten Grades auf, was als positive Familienanamnese definiert wurde. Bei der Analyse der genetischen Marker waren vier SNPs rs2619538, rs1474605, rs760761 und rs3213207 signifikant mit Schizophrenie assoziiert, am stärksten rs760761 mit einem p-Wert von 0,00018. Außer beim Marker rs2619538 zeigten sich dabei die häufigeren Allele assoziiert (Riley et al. 2009). In der Haplotyp-Analyse zeigte sich die Kombination der folgenden fünf Marker rs1474605–rs1018381–rs2619522–rs760761–rs2005976 mit der Allelkombination A-C-T-C-G, dem jeweils häufigeren Allel, bei einem p-Wert von 0,0002 signifikant mit Schizophrenie assoziiert (Riley et al. 2009). Eine zweite Analyse zeigte

keine Unterschiede in den Assoziationssignalen bei unterschiedlichen Geschlechtern oder im Fall positiver Familienanamnese (Riley et al. 2009). Damit konnten die Ergebnisse der Untersuchung eines schwedischen Kollektivs durch Van den Bogaert et al. (2003) nicht bestätigt werden, die einen Zusammenhang zwischen positiver Familienanamnese und Assoziationssignalen gefunden hatten.

### **Betcheva et al. 2009**

In dieser Studie wurden insgesamt 202 SNPs aus 59 potentiellen Kandidatengenen ausgewählt, die bereits zuvor Hinweise auf eine Assoziation mit Schizophrenie gezeigt hatten. Darunter auch Marker auf dem DTNBP1-Gen, wie rs1047631, rs3213207, rs1011313, rs2619538 und rs2619522. Die SNPs wurden an einem bulgarischen Kollektiv von 255 Patienten mit Schizophrenie oder schizoaffektiver Störung und 556 gesunden Kontrollen genotypisiert. Von den 183 erfolgreich genotypisierten Markern zeigte sich nur einer, rs6277, im DRD2-Gen mit einem p-Wert von 0,001 signifikant mit Schizophrenie assoziiert und stützt, den Autoren der Studie zufolge, vor allem die Dopamin-Hypothese (Betcheva et al. 2009).

### **Voisey et al. 2010**

Mit Hilfe von Haplotyp-basierten Analysen wurden elf *tag*-SNPs und zwei *non-synonymous*-SNPs, d.h. SNPs, die in einer für das Protein kodierenden Region liegen und zu einem Aminosäureaustausch führen, identifiziert. Diese SNPs wurden an einem australischen Kollektiv von 160 schizophrenen Patienten einer nicht näher definierten Population und 250 Kontrollen untersucht. Vier der Marker, rs1997679, rs9370823, rs9370822 und rs4236167 zeigten eine Assoziation mit Schizophrenie. Bei keinem dieser Marker war das zuvor festgestellt worden. Das stärkste Signal zeigte der Marker rs9370822. Dieser SNP mit den möglichen Allelen A/C liegt im Intron7. In der Studie zeigte sich, dass das Schizophrenie-Risiko für homozygote C-Allel-Träger mehr als zweieinhalb Mal so hoch ist als bei den Kontrollen.

### **Strohmaier et al. 2010**

In dieser Studie wurden 38 SNPs im DTNBP1-Gen an einem Kollektiv von 634 Patienten, die nach DSM-IV die Kriterien für Schizophrenie erfüllten, genotypisiert. Es bestand aus 776 Kontrollen und 180 Eltern-Kind-Trios. 320 der 634 Fälle stammten aus dem Kollektiv, das bereits von Van Bogaert et al. (2003) untersucht worden war, 36 der Familien waren bereits in der Studie von Schwab et al. (2003) analysiert wor-

den. Strohmaier et al. unterschieden zwei Subgruppen nach Familienanamnese: 147 Patienten mit einem schizophrenen Verwandten ersten oder zweiten Grades und Patienten ohne positive Familienanamnese. Für keinen der untersuchten Marker, darunter auch rs1047631 und rs2056943 konnte ein Assoziationssignal nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es einerseits eine ganze Reihe von Studien gibt, die bei unabhängigen Kollektiven signifikante Assoziationssignale für Schizophrenie an unterschiedlichen Varianten des DTNBP-1-Gens geliefert haben. Das zeigten u.a. die Ergebnisse der Studien von Straub et al. 2002, Van den Oord 2003, Schwab et al. 2003, Van den Bogaert 2003, Williams et al. 2004 und Funke et al.. Andererseits konnten Folgestudien an unterschiedlichen Populationen diese Ergebnisse nicht bestätigen, u.a. Turunen et al. 2006, Datta et al. 2007, Joo et al. 2007, Holliday et al. 2006, Peters et al. 2008, Sanders et al. 2008, Dutt et al. 2009 und Strohmaier et al. 2010 (s. Tab. 1.3.1, S. 46). Sie fanden keine Assoziationen der untersuchten Polymorphismen im DTNBP1-Gen.

Auch in den jüngsten GWAS wurde das DTNBP-1-Gen nicht als Top-Kandidatengen, ursächlich für Schizophrenie identifiziert. So zeigte die Untersuchung der Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium 2014 vielmehr Hinweise auf das Gen DRD2, bei Ripke et al. 2011 gab es starke Assoziationssignale im Gen MIR137.

Trotzdem besteht aufgrund der bisherigen Ergebnisse Grund zur Annahme, dass genetischen Variationen im DTNBP1-Gen zumindest eine Bedeutung bei der Entstehung von Schizophrenie beigemessen werden muss, obwohl eine spezifische Veränderung bislang nicht identifiziert werden konnte.



## Einleitung

Tab. 1.3.1: Überblick und Auswahl von Assoziationsstudien am DTNBP-1-Gen

(nach Riley et al. 2009, modifiziert und aktualisiert)

SNP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Allel 1 (sel- tener)	T	A	G	T	G	T	A	A	A	G	G	A	G	T	G	
Allel 2 (häufiger)	A	G	A	C	T	C	G	G	G	A	C	G	A	C	A	
Population																Studie
Irisch		-	-	-	-	T	A	A	G	G	C	A		-		Straub 2002 et al.; Van den Oord et al.2003
			<u>G</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	-	-		-		
Deutsch, Israelisch, Ungarisch				<u>C</u>	<u>T</u>	<u>C</u>		<u>G</u>	<u>G</u>	<u>A</u>						Schwab et al. 2003
Schwedisch				<u>T</u>		<u>T</u>	<u>A</u>		<u>G</u>	<u>A</u>						Van den Bogaert et al. 2003
Deutsch Polnisch				-	-	-	-	-	-	-						
Chinesisch		A		<u>C</u>	<u>T</u>						G			T		Tang et al. 2003
		<u>A</u>									<u>G</u>					
UK	T						-		-	-	-				-	Williams et al. 2004
UK	<u>T</u>									<u>A</u>	<u>C</u>					
Irisch	<u>T</u>									<u>A</u>	<u>C</u>					
Bulgarisch							G		-	A	C					Kirov et al. 2004
							<u>G</u>		<u>A</u>	<u>A</u>						
US-afroam. - kaukasisch - hispanisch		-		T	G	-		A	-							Funke et al.2004
		-		T	G	T		A	-							
		<u>G</u>		<u>T</u>	<u>G</u>	<u>T</u>		<u>A</u>	<u>G</u>							
Japanisch	A				G	T			-	G						Numakawa et al. 2004
									<u>G</u>	<u>G</u>						
Chinesisch		-			-	-	-	G	-	A	-					Li et al. 2005
Schottisch	-	-		-	-	-	<u>G</u>	<u>G</u>	-	-	-					
						<u>C</u>	<u>A</u>									
Kanadisch															-	DeLuca et al. 2005
Australisch		-	-	-	-			-	-	-	-	-		-		Holliday et al.2006
Indisch		-	-	-	-			-	-	-	-	-		-		
Koreanisch	-				-	-			-	-						Joo et al. 2006
Finnisch		-			-			-	-		-			-		Turunen et al. 2007
Italienisch	-	-		-	-	-	-	-	-	-						Tosato et al. 2007
						<u>C</u>	<u>A</u>									
UK	-				-	-	-		-	-	-					Datta et al. 2007
US	-	-			-	-	-		-	-	-			-		Duan* et al. 2007
Europäisch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-		Sanders et al. 2008
Australisch	-	-		-	-			-	-	-			-			Peters et al. 2008
Bulgarisch	-	-	-	-	-	-			-	-				-	-	Betcheva* et al. 2009
Irisch, UK													-		-	Dutt et al., 2009
Irisch	T		A	-	-	C	-		-	A	-					Riley et al. 2009
			<u>A</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>G</u>									
Deutsch	-			-	-			-	-				-	-	-	Strohmeier et al. 2010
Australisch														-	-	Voisey* et al. 2010

(Bei Assoziation eines Markers ist das jeweils assoziierte Allel in schwarzem Großbuchstaben gezeigt.

An Haplotypen beteiligte Marker, die Assoziation mit Schizophrenie gezeigt haben, sind kursiv und unterstrichen dargestellt.

Strich (-) bedeutet SNP: wurde genotypisiert, es ergab sich keine signifikante Assoziation mit Schizophrenie.

SNP1 bis 15 liegen auf dem DTNBP1-Gen in 5'-3'-Richtung, wobei SNP=rs2619538, SNP2=rs909706, SNP3=rs1474605, SNP4=rs1018381, SNP5=rs2619522, SNP6=rs760761, SNP7=rs2005976, SNP8=rs2619528, SNP9=rs1011313, SNP10=rs3213207, SNP11=rs2619539, SNP12=rs742105, SNP13=rs2056943, SNP14=rs742106, SNP15=1047631.

Mit Unterstreich gekennzeichnet sind die in dieser Arbeit untersuchten SNPs.

\*: Duan et al., Betcheva et al. sowie Voisey et al. fanden Assoziationen, aber nicht bei Markern SNP1-15)

### 1.4 Fragestellung

Eine genetische Komponente bei der Pathogenese der Schizophrenie gilt als unbestritten. Aufgrund von morphologischen und molekularbiologischen Untersuchungen sowie genetischer Kopplungs- und Assoziationsstudien hat sich das DTNBP1-Gen als eines der Suszibilitätsgene für Schizophrenie herausgestellt. Die initialen Assoziationsbefunde von Straub et al. 2002 und Van den Oord et al. 2003, die mehrere genetische Marker auf dem DTNBP1-Gen als mit Schizophrenie assoziiert zeigen konnten, wurden in einer Vielzahl von Folgestudien zu replizieren versucht. Die dabei bislang erzielten Ergebnisse sind jedoch sehr inkonsistent, was mit unterschiedlichen Stichprobengrößen, Ethnien, Einschlusskriterien für Patienten- und Kontrollgruppen, aber auch mit der Heterogenität der Erkrankung zusammenhängen könnte.

Ziel dieser Arbeit war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen bereits in anderen Studien untersuchten Einzelbasen-Polymorphismen und Schizophrenie an einem kaukasischen Kollektiv zu untersuchen. Dabei wurde versucht an einem umfangreichen, sehr restriktiv ausgewählten Patientenkollektiv, bereits erzielte Assoziationshinweise dieser SNPs zu replizieren. Dazu wurden in einer Fall-Kontroll-Studie insgesamt sechs SNPs genotypisiert und die Allel- und Genotypfrequenzen bei schizophrenen Patienten mit denen gesunder Kontrollen verglichen und auch die Auswirkungen von Dominanz oder Rezessivität des jeweils selteneren Allels auf Assoziationshinweise untersucht. Um die Vermutung zu überprüfen, dass die Assoziationssignale positiv mit der familiären Belastung korrelieren, wurden die Ergebnisse auch im Hinblick auf Unterschiede in der Familienanamnese bei der Patientengruppe analysiert.

Insgesamt soll diese Arbeit dazu beitragen, die Bedeutung von Variationen im DTNBP1-Gen zu zeigen und helfen, deren Einfluss bei der Entstehung von Schizophrenie weiter aufzuklären.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Studienvoraussetzungen**

Das Studiendesign wurde vor Durchführung von der lokalen Ethikkommission überprüft und genehmigt. Alle Teilnehmer wurden umfassend über die Ziele der Studie sowie den genauen Ablauf von Befragungen, Blutentnahmen und Untersuchungen informiert. Dabei unterlagen alle Daten in ihrer weiteren Verwendung strengster Vertraulichkeit und wurden für die Studie anonymisiert. Auch darüber wurden alle Teilnehmer vor Beginn der Studie aufgeklärt. Die Teilnahme an der Studie war freiwillig. Alle Probanden gaben dazu vor Beginn schriftlich ihr Einverständnis.

### **2.2 Studienpopulation**

#### **2.2.1 Kontrollgruppe**

Die Stichprobe bestand aus 1290 Probanden deutscher Abstammung aus der allgemeinen Bevölkerung Münchens. Dabei handelte es sich um 586 Männer und 704 Frauen, dementsprechend betrug die prozentuale Verteilung zwischen männlichen und weiblichen Teilnehmern 45,4% zu 54,6%. Der Altersdurchschnitt betrug rund 46 Jahre (s. Tab. 2.1, S. 52). 577 Probanden (45%) verfügten über einen hohen Bildungsstand und hatten mindestens Abitur, 424 Probanden (33%) hatten mittlere Reife und 289 Personen (22%) Hauptschulabschluss (s. Tab. 2.2, S.52).

Lediglich nicht verwandte, gesunde Personen wurden in die Kontrollgruppe aufgenommen. Dabei erfolgte die Rekrutierung der Teilnehmer in mehreren Schritten. Die zuvor zufällig ausgewählten Kandidaten wurden angeschrieben und über die Studie informiert. Nach einer positiven Rückantwort wurden die potentiellen Teilnehmer telefonisch nach psychiatrischen und hirnerkrankungen befragt, auch bezüglich ihrer Verwandten ersten Grades. Dabei wurde explizit nach depressiven oder manischen Episoden, Phasen mit großer Angst, Essstörungen, Alkohol- oder Drogenkonsum, Suizidversuchen, Fällen von Selbsttötung bei Verwandten und nach der Abstammung gefragt. Nur bei Abwesenheit von Vorerkrankungen sowohl bei der Kontrollperson selbst als auch deren Verwandten erfolgte die Einladung zu einem persönlichen, umfassenden Interview der potentiellen Kontrollteilnehmer.

Die Kandidaten wurden dann mittels des Strukturierten Klinischen Interviews (SKID: Wittchen et al. 1997) befragt. Das SKID dient der Erfassung und Diagnostik ausge-

wählter psychischer Störungen, wie sie im DSM-IV der *American Psychiatric Association* in seiner vierten Revision von 1994 definiert werden (DSM-IV dt.: Wittchen et al. 1996). Dabei kamen sowohl das SKID-I als auch das SKID-II zur Anwendung. Das SKID-I dient der Diagnose von Achse-I-Störungen (Psychopathologie) wie sie im DSM-IV definiert werden. Darunter fallen affektive Störungen, psychotische Störungen, Störungen durch psychotrope Substanzen, Angststörungen, somatoforme Störungen, Essstörungen und Anpassungsstörungen. Gleichzeitig werden im SKID-I Kodierungsmöglichkeiten für die Beurteilung von Achse III (körperliche Störungen) und Achse V (Psychosoziales Funktionsniveau) angeboten. Alle Diagnosen werden im Längs- und Querschnitt sowie mit Zusatzinformationen über Beginn und Verlauf erhoben. Das SKID-II dient der Diagnostik der im DSM-IV aufgeführten Achse-II-Störungen, den Persönlichkeitsstörungen. Dabei handelt es sich um ein zweistufiges Verfahren. Mit Hilfe eines Fragebogens werden die Kriterien für die zwölf im DSM-IV erfassten Persönlichkeitsstörungen abgefragt. Im nachfolgenden Interview müssen dann nur noch diejenigen Fragen gestellt werden, die zuvor im Fragebogen mit „ja“ beantwortet wurden. Durch dieses zweistufige Verfahren wird eine vergleichsweise geringe Durchführungszeit für das Interview erreicht.

Psychiatrische Diagnosen unter Verwandten ersten Grades wurden mit dem *Family History Assessment Module* (Rice et al. 1995) eruiert. Ein Studieneinschluss erfolgte nur bei negativer psychiatrischer Familienanamnese sowie bei Abwesenheit somatischer Krankheiten und von Störungen der Achse I/II (*lifetime*).

### 2.2.2 Patientengruppe

Die Patientengruppe bestand aus 503 schizophrenen Personen kaukasischer Abstammung mit einem Altersdurchschnitt von 37,7 Jahren. 329 Patienten (65,4%) waren männlichen Geschlechts und 174 Patienten (34,6%) weiblichen Geschlechts (s. Tab. 2.1, S. 52).

Unterschieden nach dem Bildungsstand hatten 216 Patienten (43%) die Hauptschule besucht, 131 Patienten (26%) hatten mittlere Reife und 156 Patienten (31%) hatten mindestens Abitur (s. Tab. 2.2, S. 52).

Differenziert nach den Ergebnissen der Familienanamnese zeigte sich, dass 368 Patienten einen Angehörigen mit einer psychiatrischen Erkrankung in der Familie hatten, 146 Patienten einen Angehörigen mit Schizophrenie (ab Angehöriger 2. Grades)

und 96 Patienten einen schizophrenen Angehörigen 1.Grades. Einen genauen Überblick über Geschlechts-, Alters- und Bildungsgradverteilung zeigen die Tabellen 2.1 und 2.2 (S. 52).

Der Einschluss der Probanden in die Patientengruppe wurde im Rahmen dieser sehr spezifischen Studie äußerst restriktiv gehandhabt. Es wurden lediglich Patienten eingeschlossen, die nach den Kriterien des DSM-IV eindeutig als an Schizophrenie vom paranoiden, desorganisierten, katatonen, undifferenzierten oder residualen Typus erkrankt diagnostiziert werden konnten. Um das Vorliegen einer Schizophrenie nach den Richtlinien des DSM-IV zu diagnostizieren, war dabei das Vorhandensein von mindestens zwei der folgenden fünf Merkmale gefordert:

Wahn, Halluzinationen, desorganisierte Sprechweise (wie häufiges Entgleisen oder Zerfahrenheit), grob desorganisiertes oder katatones Verhalten, Negativsymptomatik (wie flacher Affekt, Alogie, Antriebshemmung).

Bei Vorliegen von bizarren Wahnvorstellungen oder wenn Halluzinationen aus kommentierenden oder dialogisierenden Stimmen bestehen, fordert das DSM-IV lediglich das Vorhandensein eines der oben genannten Kriterien. Als zeitliches Kriterium für das Vorliegen einer Schizophrenie gibt das DSM-IV eine minimale Dauer von sechs Monaten an. Darin sind auch Perioden mit prodromalen oder residualen Symptomen eingeschlossen, die durch ausschließlich negative Symptomatik gekennzeichnet sein können. Allerdings muss mindestens ein Monat lang ein florides Stadium der Erkrankung mit den oben genannten Akut-Kriterien bestanden haben. Ein klinisch bedeutsames Leiden mit zumindest zeitweise deutlichem Absinken des Funktionsniveaus im sozialen- oder Arbeitsbereich wird verlangt.

Um den Einschlusskriterien dieser Studie gerecht zu werden, war eine sorgfältige Anamnese notwendig. Zunächst wurde in einer standardisierten Erhebung unter anderem die Lebensgeschichte, eventuelle Geburtskomplikationen, der schulische und berufliche Werdegang, der Krankheitsverlauf, Drogenkonsum, Medikation, stationäre Aufenthalte in psychiatrischen Kliniken, Suizidversuche, die familiäre und soziale Situation sowie die ethnische Abstammung eruiert und eine Familienanamnese durchgeführt. Dabei wurden die Patienten auch nach Angehörigen mit psychiatrischen Erkrankungen und hier speziell auch Schizophrenie gefragt. Wurde die Frage nach ei-

nem schizophrenen Angehörigen bejaht, wurde noch einmal speziell nach Angehörigen 1. Grades unterschieden.

Patienten mit hirnorganischen Störungen wie Demenz, Epilepsie, Morbus Parkinson oder auch somatische Erkrankungen mit z.B. Störungen des Hormon-, Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushaltes, wurden von der Studie ausgeschlossen ebenso Patienten mit florider Hepatitis B und C, HIV-Positivität oder anamnestischem Verdacht für intravenösen Heroinkonsum (*lifetime*-Abhängigkeit).

Um differentialdiagnostisch Patienten mit der Diagnose Schizophrenie von denen mit einer schizoaffektiven Störung, einer affektiven Störung mit psychotischen Merkmalen, einer schizophreniformen Störung, einer nur kurzen oder nicht näher zu bezeichnenden psychotischen und rein wahnhaften Störung oder einer schizotypischen Persönlichkeitsstörung abzugrenzen, die ebenfalls nicht in die Patientengruppe aufgenommen werden sollten, kam auch hier das Strukturierte Klinische Interview I (SKID-I) zur Erfassung der Achse-I-Störungen zur Anwendung. Je nach vorherrschendem klinischen Bild und Symptomatik konnten die Patienten dem jeweiligen phänomenologischen Subtypen (desorientiert, kataton, paranoid, residual, undifferenziert) zugeordnet werden.

Bei der Beurteilung des Schweregrades waren der aktuelle Zustand des Patienten sowie die Ausprägung der in der Krankengeschichte jeweils schwersten Episode entscheidend. Beim Krankheitsverlauf wurden eventuelle Prodromalphasen, Alter bei Erstmanifestation, Verlaufsmuster (episodisch, kontinuierlich, unspezifisch) und der Remissionsgrad erfasst. Bei chronischem Verlauf wurde die Art der Symptomatik, wie z.B. das Vorhandensein einer deutlichen Negativsymptomatik dokumentiert. Des Weiteren wurden mithilfe des SKID eventuelle Komorbiditäten, unter anderem Substanzabusus oder Angststörungen, eruiert. Mit dem SKID II wurden Störungen der Persönlichkeit erfasst. Die Differenzierung erfolgte in selbstunsichere, dependente, zwanghafte, negativistische, depressive, paranoide, schizotypische, schizoide, histrionische, narzisstische, Borderline und antisoziale Persönlichkeitsstörungen. Mit der PANSS (*Positive and Negative Syndrome Scale for Schizophrenia*) (Kay et al. 1987) wurden die Positiv- und Negativsymptome sowie allgemeine psychopathologische Symptome in sieben Graduierungen bewertet.

**Tab. 2.1: Alters- und Geschlechtsverteilung Patienten und Kontrollgruppe**

	Patienten				Kontrollen
	insgesamt	mit psychisch kranken An- gehörigen	mit Angehörigen mit Schi- zophrenie	mit Angehörigen 1.Grades mit Schi- zophrenie	
<b>Alter</b> in Jahren (SD)	37,7 (11,4)	38,0 (11,2)	38,4 (11,4)	40,6 (11,5)	46,2 (15,6)
<b>Geschlecht (%)</b> männlich:	329 (65,4)	236 (64,1)	90 (61,6)	58 (60,4)	586 (45,4)
weiblich:	174 (34,6)	132 (35,9)	56 (38,4)	38 (39,6)	704 (54,6)

SD=Standardabweichung vom Mittelwert

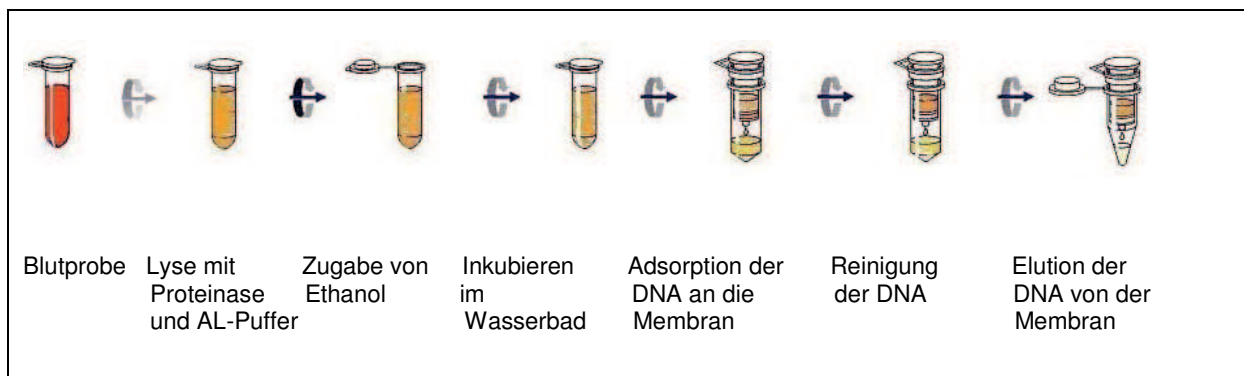
**Tab. 2.2: Bildungsstand Patienten und Kontrollgruppe**

Bildungs- Stand (%)	Patienten				Kontrollen
	insgesamt	mit psychisch kranken An- gehörigen	mit Angehörigen mit Schizophrenie	mit Angehörigen 1.Grades mit Schi- zophrenie	
niedrig	216 (43)	156 (42,4)	66 (45,2)	47 (49)	289 (22,4)
mittel	131 (26)	86 (23,4)	32 (21,9)	17 (17,7)	424 (32,9)
hoch	156 (31)	126 (34,2)	48 (32,9)	32 (33,3)	577 (44,7)

## 2.3 DNA-Extraktion

Um die DTNBP1-Genotypen der Studienteilnehmer zu ermitteln, wurde hochreine genomische DNA benötigt. Die Isolierung dieser genomischen DNA aus dem venösen Blut der Probanden erfolgte unter Verwendung eines handelsüblichen Kits der Firma Qiagen (QIAamp® DNA Blood Maxi Kit, Qiagen, Hilden, Germany, 2005) gemäß der vorgegeben Anleitung (Abb. 2.3.1).

Das von den Studienteilnehmern mittels EDTA-Monovetten venös abgenommene Blut wurde noch am gleichen Tag zu Anonymisierungszwecken kodiert und dann bei 4000 Umdrehungen pro Minute (rpm) 15 Minuten lang bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma abpipettiert und der verbleibende Blutkuchen bei minus 20°C eingefroren.



**Abb. 2.3.1 : DNA-Extraktion gemäß Anleitung des QIAamp DNA Blood Midi/Maxi Kit Handbook (Qiagen, 2005)**



**Tab. 2.3.1: Übersicht zu Materialien zur DNA-Extraktion**

Material	Hersteller
<b>Verbrauchsmaterialien</b>	
50ml Zentrifugenröhre	Sarstedt, Nürnberg
Collection Tubes	Qiagen, Hilden
EDTA Monovette	Sarstedt, Nürnberg
Eppendorf Research Pipette (100-1000 µl; 10-100µl; 1-10µl)	Eppendorf, Hamburg
Micro Schraubröhre, 2.0 ml	Sarstedt, Nürnberg
QIAamp Maxi Spin Röhrchen	Qiagen, Hilden
<b>Reagenzien und Puffer</b>	
10x PBS-Puffer bestehend aus: 80g NaCl 2g KCl 14,4g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,4g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Ad 1l mit Aqua dest. Mit NaOH auf pH 7,4	Eigene Herstellung
1x PBS-Puffer bestehend aus: 100ml 10xPBS-Puffer 900ml Aqua dest.	Eigene Herstellung
Ethanol Rotipuran >99,8 %	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (TitrierkomplexIII)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe
Puffer AE	Qiagen, Hilden
Puffer AL	Qiagen, Hilden
Puffer AW1	Qiagen, Hilden
Puffer AW2	Qiagen, Hilden
Qiagen Protease	Qiagen, Hilden
<b>Geräte</b>	
Vortex Genie	Scientific Industries, New York, USA
Rotixa RP Standardzentrifuge	Hettich, Tuttlingen
WB Wasserbad	Memmert, Schwabhausen

Um die DNA zu extrahieren wurde nach dem Protokoll des Quiagen DNA *Blood Maxi Kits* (Quiagen 2002) verfahren. Dabei wurde der tiefgefrorene Blutkuchen zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und mit dem gleichen Volumen an einfach PBS-Puffer versetzt, um die Zellen zu resuspendieren. Nun wurden jeweils 10ml Blutlösung zur Zellyse und Freisetzung der Nukleinsäuren mit 12ml Qiagen Puffer AL und 500µl Qiagen Protease versetzt. Die Qiagen Protease verdaut Proteine, die später die Polymerasekettenreaktion (PCR) behindern können, insbesondere Hämoglobin, Nukleasen und Histone. Der Guanidin-HCL-haltige Lysepuffer Qiagen Puffer AL sorgt gemeinsam mit der Qiagen Protease für die Zellyse. Dabei degradiert das chaotrope Salz auf Guanidium-Basis die Zellmembranen und denaturiert die Proteine (Grieß et al. 2002). Die Qiagen Protease hydrolysiert enzymatisch Peptidbindungen. Zur Gewährleistung einer vollständigen Zellyse wurde diese Lösung anschließend zwei Minuten lang auf dem Vortexer durchgemischt und dann im Wasserbad bei 70°C unter gleichzeitigem Schütteln 10 Minuten lang inkubiert.

Nun folgte die Entfernung der Hydrathülle der DNA. Die ist notwendig für die spätere Adsorption der DNA auf der Silikagel-Säule. Dazu wurden der Probe 10ml Ethanol 96-100% zugegeben und diese anschließend zwei Minuten lang auf dem Vortexer gemischt. Danach wurde die Lösung auf die Silikamembran aufgetragen und drei Minuten lang bei 3000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert (Quiagen 2002). Dabei sorgten Salzgehalt und pH-Wert dafür, dass RNA und Nukleinsäure-bindende Proteine, welche die PCR später stören könnten, ungebunden blieben und die DNA selektiv auf das Säulenmaterial ausgefällt werden konnte (Grieß et al. 2002). In zwei Waschschritten wurden nun störende Proteine und RNA-Reste mit dem Puffer AW1 sowie verbleibende Guanidinsalze mit ethanolhaltigem, salzarmen Waschpuffer AW2 (Firma Quiagen, Hilden) entfernt. Die so gereinigte DNA wurde dann unter Zugabe von 1ml eines Tris-haltigen Puffers AE (pH > 9,0) rehydratisiert und dann von der Silikamembran eluiert. Dabei wurde zunächst für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich zwei Minuten lang bei 5000rpm zentrifugiert. Da die DNA nur in saurem Milieu an die Silikamembran bindet, löst sie sich durch die Zugabe des basischen Tris-Puffers wieder ab (Quiagen 2002). Die so gewonnene DNA wurde für die PCR verwendet.

## 2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

**Tab. 2.4.1: Übersicht zu Materialien zur DNA-Konzentrationsbestimmung**

Material	Hersteller
Verbrauchsmaterialien	
96 Well Flat Bottom Plates	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Selbstklebende Aluminiumfolie	Eppendorf, Hamburg
50ml konische PP – Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Reagenzien und Puffer	
PicoGreen dsDNA quantitation reagent	Invitrogen, Karlsruhe
1x TE (pH 7,4), Tris Base, EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Human Genomic DNA 100ng/µl	Clontech, Mountain View, USA
Geräte	
Tecan GENios Workstation 150	Applied Biosystems, Foster City, USA
Vortex Genie	Scientific Industries, New York, USA
Rotixa RP Standardzentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Eppendorf Research Pipette (100-1000 µl; 10-100µl; 1-10µl)	Eppendorf, Hamburg

Um die extrahierten DNA-Proben auf die anschließende Genotypisierung vorzubereiten und die daran geknüpften Bedingungen bezüglich der Konzentration der Proben zu erfüllen, wurde die DNA-Konzentration jeder einzelnen Probe mittels PicoGreen-Methode bestimmt. Bei dieser hochempfindlichen Methode, bei der auch geringste Mengen an DNA quantifiziert werden können, macht man sich die Eigenschaft des Fluoreszenzfarbstoffes PicoGreen zu Nutze, spezifisch nur an doppelsträngiger DNA zu binden (Rengarajan et al. 2002).

Anhand einer Standardkurve aus genomischer DNA (gDNA) (Clontech, Mountain View, USA) (100ng/µl; 50ng/µl; 25ng/µl; 12,5ng/µl; 6,25ng/µl; 3,125ng/µl; 1,5625ng/µl; 0ng/µl (blind)) wurde auf die unbekannte Konzentration der DNA-Proben geschlossen.

Als erster Schritt zur Konzentrationsbestimmung wurden in die schwarzen 96 *Well* Platten mit flachem Boden Duplikate von je 5µl der gDNA Standard Verdünnungsreihe sowie der zu messenden DNA-Proben jeweils in Duplikaten pipettiert.

Zur Herstellung des PicoGreen-Gemischs wurden die PicoGreen Reagenzien für ca. 60 Minuten bei Raumtemperatur in einem lichtundurchlässigen Behälter aufgetaut und anschließend in einer ebenfalls lichtundurchlässigen, mit Aluminiumfolie umhüllten, 50ml Zentrifugenröhre (Sarstedt) eine 200fache Verdünnung des Farbstoffs mit 1xTE hergestellt. Nun wurde die Lösung im Vortexer gemischt, anschließend jeweils 195µl der PicoGreen-Verdünnung auf die vorgelegte DNA pipettiert und die Platte sodann mit Aluminiumfolie zugeklebt.

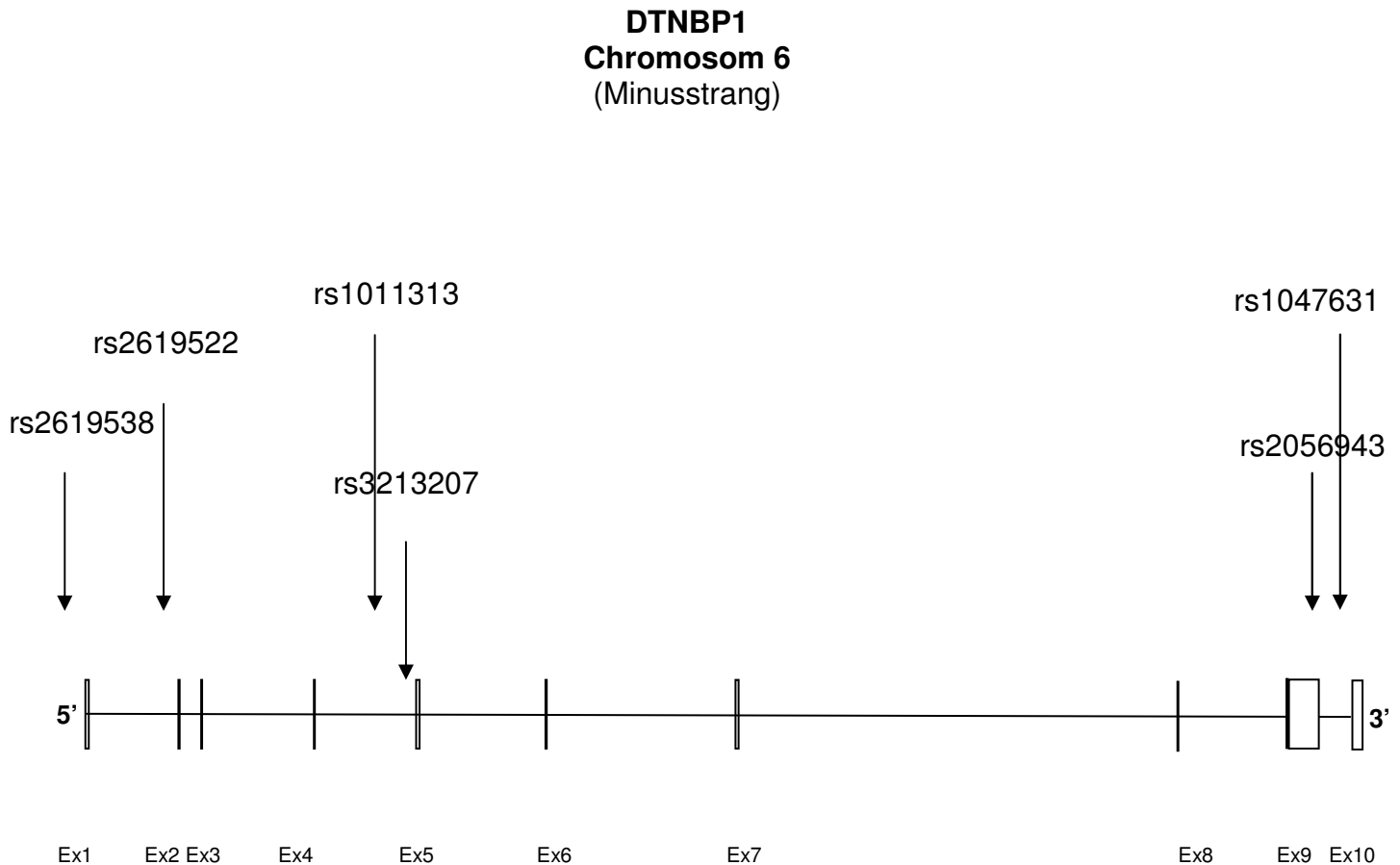
Unmittelbar nach Zugabe des PicoGreen-Puffer-Gemischs wurde der Farbstoff mit Licht in einer Wellenlänge von 485nm angeregt, dann die Fluoreszenz mittels Tecan GENios Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Leser (Tecan, Crailsheim) bei 540nm gemessen und mit der Tecan GENios Workstation 150 (Software) (Applied Biosystems, Foster City, USA) ausgewertet. Dabei war zügiges Arbeiten wichtig, da es bereits nach etwa 15min zu einem deutlichen Abfall der Emissionen kommt. Anschließend folgte eine 8-Punkt-Kalibrierung der ermittelten Werte anhand der Standardkurve. Dabei war bei der Überprüfung der Qualität ein Pearsonscher Korrelationskoeffizient von  $r = 0,99$  erwünscht, ein  $r = 0,98$  wurde als akzeptabel eingestuft. Anhand der so gemessenen Konzentrationen konnten mittels Zugabe der entsprechenden Menge TE-Puffers die Proben auf die gewünschte Konzentration von jeweils 50ng/µl eingestellt werden.

## 2.5 Genotypisierung

### 2.5.1 Beschreibung der untersuchten SNPs

In Anlehnung an die Ergebnisse bisheriger Assoziationsuntersuchungen im DTNBP1-Gen wurden in dieser Arbeit folgende sechs SNPs genotypisiert: rs1047631, rs2056943, rs3213207, rs1011313, rs2619522 und rs2619538 (Tab.2.5.1 S.59). Die Abstände zwischen Exons, Introns und den einzelnen Markern orientieren sich an den physikalischen Abständen der Transskriptvariante NM\_032122 (OMIM 607145). Insgesamt sind die sechs Marker über das gesamte DTNBP1-Gen verteilt. Die SNPs rs3213207, rs1011313 und rs2619522 befinden sich in den Introns eins und vier, SNP rs1047631 in Intron 9. Ein SNP ist außerhalb des Gens in der putati-

ven Promotorregion des Gens im 5'-Genbereich lokalisiert (rs2619538) und ein SNP (rs2056943) liegt im untranslatierenden Bereich des Exons 9 (NCBI 2014, UCSC 2009).



**Abb. 2.5: Lage der in dieser Arbeit untersuchten Marker auf dem DTNBP-1-Gen**

Die SNPs wurden mittels der *Mass Array Assay Design 3.1.2.5 Software* (Sequenom, San Diego, USA) zu MultiPLEXen zusammengestellt und dann das Primerdesign entworfen, bestehend aus einem Primer-Set je SNP von zwei PCR-Primern und einem Extensionsprimer (s. Tab. 2.5.2, S. 59). Gleichzeitig ermittelte die Software die optimale Plexzusammenstellung.

**Tab.2.5.1: Lokalisation und Funktion der untersuchten SNPs**

SNP-ID	Chromosom 6 Position	Allel	Funktion
rs1047631	15523101	A/G	Intron 9
rs2056943	15524563	A/G	3'-UTR, Exon 9
rs3213207	15628102	A/G	Intron 4
rs1011313	15633432	G/A	Intron 1
rs2619522	15653649	G/T	5' UTR
rs2619538	15665209	A/T	5'-Genregion

**Tab.2.5.2: Primersequenzen**

SNP-ID/	Primer 1	Primer 2	Fragmentlänge	Extensionsprimer
rs1047631	5'-*CAGTTTACCG TCCTCACAC-3'	5'-*GCCAGGTTGT TTTATAGAGG-3'	122bp	gttaTCACACA GGCAATTA
rs2056943	5'-*TCACCAAAGT TACCGGAGTG-3'	5'-*CTGCAACAGT GGTGTGGTTC-3'	94bp	gatCATGTCAAAT CTTTGAGAAGAA
rs3213207	5'-*TCTTTGAAGA CTTCCTTTTCG-3'	5'-*CTACCACTAA CAACCAAAAAG-3'	104bp	ccTCCTTTTCG TAAAGCCA
rs1011313	5'-*CCAAGTTACT GCACACAAGC-3'	5'-*ATTCACAGGC TACAGAAATGG -3'	102bp	TTGTTTTTCAT- GCCCACTAA
rs2619522	5'-*GGCTCTTATG TCTACCTTTC-3'	5'-*GCAGAAGCAG TGAGTGAGAG -3'	100bp	CCATTGGTCAC- CTGG
rs2619538	5'-*TCACTGTTTT CATTGCTGGG-3'	5'-*AGTGAGGTAA GTAGCACAAG -3'	105bp	AGACAGAGCAGT TTACATC

\* = ACGTTGGATG (*mass tags*)

Die eigentliche Genotypisierung der DNA-Proben erfolgte mittels Massenspektrometrie nach dem MALDI-TOF System (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*) (Karas und Hillenkamp 1988). Das Prinzip der Methode beruht darauf,

dass Teilchen mit unterschiedlichen Massen, wenn sie gleichermaßen beschleunigt werden, abhängig von ihrer Masse unterschiedliche Flugzeiten aufweisen. Die gemessenen Flugzeiten allelspezifischer Primerextensionsprodukte lassen dann Rückschlüsse auf die molekulare Masse des gemessenen Teilchens zu, so dass mit diesem Verfahren am Ende ein eindeutiger Schluss auf den Genotyp des untersuchten SNPs gezogen werden kann.

Um für jedes Allel ein massenspezifisches Produkt zu erzeugen, wurde das iPLEX-Verfahren angewandt. Grundidee ist dabei das Prinzip der Einzelbasenverlängerung, dass von Haff und Kollegen entwickelt worden war (Haff und Smirnov 1997). Beim iPLEX-Verfahren handelt es sich um eine MultiPLEX-PCR in der bis zu 36 SNPs gleichzeitig genotypisiert werden können. Im ersten Schritt wird dabei der zu untersuchende Bereich des Genoms mittels PCR amplifiziert. Im zweiten Schritt wird für jedes Allel im Sinne einer Einzelbasenverlängerung des jeweiligen SNPs ein massenspezifisches Produkt erzeugt (Oeth et al. 2005).

## 2.5.2 iPLEX-Verfahren: initiale PCR

**Tab. 2.5.3: Reagenzien, Materialien und Geräte für die initiale PCR**

Material	Hersteller
Reagenzien und Puffer	
Destilliertes, UV-sterilisiertes H <sub>2</sub> O	
PCR Puffer mit MgCl <sub>2</sub>	Qiagen, Hilden
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	Qiagen, Hilden
dNTP Mix, (25mM)	ABgene, Hamburg
Primer Mix (jeweils 500nM)	Qiagen, Hilden
Genomische DNA (jeweils 12.5ng)	
Hotstar Taq (5U/μl)	Qiagen, Hilden
Verbrauchsmaterialien	
Dan Klorix (2%ige Hypochlorid-Lösung)	Colgate-Palmolive, Hamburg
Schraubröhre (15ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Easy Peel Heat Sealing Foil	ABgene, Hamburg
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
e.T.I.P.S. Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Pipettierwanne für Mehrkanalpipetten	Ratiolab, Dreieich
Mikrotestplatte 96K	Sarstedt, Nümbrecht
Thermo Fast 384 Well Plate	Abgene, Hamburg
Geräte	
PURELAB Ultra,	ELGA, Celle
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Heat Sealer ALPS-300	ABgene, Hamburg
MICROLAB MPH 96	Hamilton, Reno,USA
Gene Amp PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City, USA

Erster Schritt der Genotypisierung der sechs SNPs war die Amplifizierung der jeweiligen den SNP flankierenden genomischen Sequenz mittels PCR. Die Primer wurden am 5'-Ende mit 10 Basen langen *mass-tag*-Sequenzen versehen, so dass die Basen am 5'-Ende inkomplementär zur Zielfrequenz waren. Diese *mass-tags* sorgen vor



allem dafür, dass die Massen der Primer außerhalb des Massenfensters des Spektrometers liegen und damit bei den späteren Messungen nicht ins Gewicht fallen (Sequenom 2005). Nach einer initialen Denaturierung bei 95°C für 5min zur Auftrennung der DNA in Einzelstränge, folgten 40 Zyklen bestehend aus drei Teilschritten: Im *Annealing* wurden die DNA-Proben für 30s auf 56°C herabgekühlt, dabei lagern sich der *forward*- und der *reverse*-Primer an die Einzelstränge an, die Oligonukleotid-Primer hybridisieren mit den beiden Matrizensträngen und dienen dann der DNA-Polymerase im nächsten Schritt, der Elongation, als Startmoleküle. Während der Elongation wird die Probe für eine Minute auf 72°C erhitzt. Dabei fügt die Taq-DNA-Polymerase bei ihrem Temperaturoptimum die Nukleotide an die Primer an. Die PCR schließt ab mit einer finalen Extension bei 72°C für drei Minuten und anschließender Abkühlung auf 4°C (Sequenom 2005). Die initiale PCR wurde in 384er-Mikrotiterplatten (Abgene, Hamburg) durchgeführt. Bei allen folgenden Reaktionen wurde nur H<sub>2</sub>O verwendet, welches zuvor in einer PURELAB Ultra Wasseraufbereitungsanlage (ELGA, Celle) mittels Destillation und UV-Sterilisation deionisiert und gereinigt worden war. In einer 15ml Schraubröhre (Sarstedt, Nürnberg) wurde zunächst ein Master-Mix für die insgesamt 384 folgenden Reaktionen erstellt. Umgerechnet auf jede einzelne Reaktion wurden jeweils 1,85µl H<sub>2</sub>O, 0,625µl PCR Puffer, 0,325µl MgCl<sub>2</sub> (25nM) (Qiagen, Hilden), 0,1µl dNTP (25nM) (Abgene, Hamburg), 1µl Primer Mix (je 500 nM) (Qiagen, Hilden) zusammengegeben, gevortext und schließlich abzentrifugiert. Nach Zugabe von 0,1µl Hotstar Taq (5U/µl) wurde der Cocktail vorsichtig durch Umschwenken vermischt. Der Master-Mix wurde mittels Pipettierwanne und Mehrkanalpipette auf eine 96 Well Mikrotiterplatte aliquotiert und anschließend wurden mittels Pipettierroboter in vier Pipettierschritten jeweils 3µl Master-Mix pro Well in die 384 Well Mikrotiterplatten transferiert. Als nächstes folgte die Zugabe der DNA. Dabei wurden in ebenfalls vier Pipettierschritten aus den 96 Well Platten jeweils 2,5µl DNA (12,5ng) in jedes Well der mit dem Master-Mix gefüllten 384 Well Platte überführt. Hierbei erfolgte zwischen jedem der vier Pipettiervorgänge eine Reinigung der Pipettenspitzen mit 2%iger Hypochlorid-Lösung. Nach Zugeben der DNA wurde die 384 Well Platte verschweißt und die MultiPLEX-PCR im Thermocycler prozessiert. Bei der anschließenden Dephosphorylierung wurden dann die überschüssigen Nukleotide, die bei der PCR nicht eingebaut worden waren, inaktiviert.

### 2.5.3 iPLEX-Verfahren: Dephosphorylierung

Tab. 2.5.4: Bestandteile des SAP-Mix zur Dephosphorylierung

Reagenz	Volumen	Hersteller
Destilliertes, UV-sterilisiertes H <sub>2</sub> O	1.53µl	
SAP Puffer 10x	0.17µl	Sequenom, San Diego, USA
SAP Enzym (1U/µl)	0.30µl	Sequenom, San Diego, USA

Die Entfernung der überschüssigen Nukleotide ist notwendig, da die aktiven Nukleotide die iPLEX-Reaktion stören und damit die späteren Messwerte verfälschen könnten. Dazu wurde ein Mix bestehend aus 0,30µl SAP Enzym (SAP=Shrimp alkaline phosphatase, Sequenom, San Diego) (1U/µl), 10x 0,17µl SAP Puffer, und 1,53µl H<sub>2</sub>O verwendet (Tab. 2.5.4). Nach Zugabe von je 2µl SAP Mix wurden die Proben gemischt, abzentrifugiert und in einem Thermocycler für 40 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann folgte die Inaktivierung der SAP bei 85°C für 10 Minuten und im nächsten Schritt die Primer-Extensionsreaktion.

### 2.5.4 iPLEX-Verfahren: Primer-Extensionsreaktion

Tab. 2.5.5: Reagenzien, Materialien und Geräte für die MultiPLEX Extend-Reaktion

Materialien	Hersteller
<b>Reagenzien und Puffer</b>	
Destilliertes, UV-sterilisiertes H <sub>2</sub> O	
iPLEX Puffer 10x	Sequenom, San Diego, USA
iPLEX Termination Mix	Sequenom, San Diego, USA
Primer Mix (7µM:14 µM)	Sequenom, San Diego, USA
iPLEX Enzyme	Sequenom, San Diego, USA
<b>Verbrauchsmaterialien</b>	
Easy Peel Heat Sealing Foil	ABgene, Hamburg
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
e.T.I.P.S. Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Pipettierwanne für Mehrkanalpipetten	Ratiolab, Dreieich
Mikrotestplatte 96 K	Sarstedt, Nürnberg
Thermo Fast 384 Well Plate	Abgene, Hamburg
<b>Geräte</b>	
PURELAB Ultra	ELGA, Celle
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Heat Sealer ALPS-300	ABgene, Hamburg
Multimek Pipettierroboter	Beckmann, Fullerton, USA

## Material und Methoden

Bei der Primer-Extensionsreaktion handelt es sich um eine Einzelbasenverlängerung des zu untersuchenden SNPs, bei der für jedes Allel ein massenspezifisches Produkt entsteht. Der dazu nötige Extensionsprimer bindet unmittelbar vor dem zu untersuchenden SNP an die Produkte der initialen PCR. Die Extensionsreaktion wird mit vier Didesoxynukleotiden durchgeführt, die nach dem Einbau nicht mehr verlängert werden können, wodurch an jeden Extensionsprimer je nach Allel genau eine einzige spezifische Base anknüpft. Das Ergebnis sind DNA-Produkte mit einer allelspezifischen Masse.

Zur Vorbereitung der Primerextensionsreaktion wurde ein Master-Mix für die 384 angesetzten Reaktionen erstellt, bestehend aus 0,755µl H<sub>2</sub>O, 0,2µl iPLEX Puffer, 0,2µl iPLEX Termination Mix und 0,804µl Primer Mix (7µM-14µM) pro Einzelreaktion. Der Mix wurde gevortext und dann 0,041µl iPLEX Enzyme dazu gegeben. Mittels Pipettierwanne wurden der iPLEX-Cocktail zunächst auf eine 96 Well Platte pipettiert und dann in vier Pipettierschritten mit dem Multimek Pipettierroboter jeweils 3µl pro Well in die 384 Well Platte mit dem dephosphorylierten PCR-Produkt überführt. Danach wurde die Platte versiegelt und die Multi-Plex-Extensionsreaktion im Thermocycler in folgenden Zyklen prozessiert:

1. Initiale Denaturierung: 30 Sekunden bei 94°C
  2. 94°C für 5 Sekunden
  3. 52°C für 5 Sekunden
  4. 80°C für 5 Sekunden
  5. 72°C für 3 Minuten
  6. 4°C unbegrenzt
- } je 5 Mal
- } je 40 Mal

### 2.5.5 MALDI-TOF-Verfahren

**Tab. 2.5.6: Verbrauchsmaterialien, Geräte, Software für das MALDI-TOF-Verfahren**

Materialien	Hersteller
Destilliertes, UV-sterilisiertes H <sub>2</sub> O	
Clean Resin	Sequenom, San Diego, USA
Dimple Plate	Sequenom, San Diego, USA
PURELAB Ultra	ELGA, Celle
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
3 Point Calibra	Sequenom, San Diego, USA
AssayEditor 3.4.0.7	Sequenom, San Diego, USA
FLEXControl	Bruker Daltonics, Bremen
Mass ARRAY POINT Nanodispenser	Sequenom, San Diego, USA
MNL 200 Stickstofflaser	LTB Laser Technik
Massenspektrometer Autoflex	Bruker Daltonics, Bremen
Nitrogen Generator	Parker Balston, Haverhill, USA
PlateEditor 3.4.0.48	Sequenom, San Diego, USA
RT Workstation 3.4, Chiplinker	Sequenom, San Diego, USA
SpectroAquire 3.3.1.3	Sequenom, San Diego, USA
SpectroCHIPS	Sequenom, San Diego, USA
SpectroTARGET	Sequenom, San Diego, USA
TyperAnalyzer 3.4.0.18	Sequenom, San Diego, USA

#### 2.5.5.1 Vorbereitung der Proben

Um die Extensionsprodukte via MALDI-TOF Massenspektrometrie zu messen, mussten die Extensionsprodukte zunächst entsalzt werden. Positiv geladene Kationen (Natrium- und Kaliumionen), die sich an das Phosphatrückgrat der DNA anlagern und die anschließende MALDI-TOF-Messung stören würden, wurden durch ebenfalls positiv geladene Ammoniumionen ersetzt. Das wurde mit dem Ionenaustauschharz Clean Resin, einem effektiven Ionenaustauscher erreicht, der u.a. Alkaliionen durch Ammoniumionen ersetzt. Dazu wurde in jedes Well der 9µl Reaktionen mit Hilfe einer *dimple plate* 6mg Clean Resin aufgebracht und zusätzlich 25µl steriles, destilliertes H<sub>2</sub>O zugegeben. Nach Verschluss der Platte wurde diese für 10 Minuten rotiert, um

eine homogene Verteilung des Harzes zu erreichen. Anschließend wurde die Platte bei 4000rpm für fünf Minuten abzentrifugiert. Dabei setzte sich das Harz am Boden der Wells ab, wodurch eine Beeinflussung der nachfolgenden Messung der Extensionsprodukte ausgeschlossen ist. Auch nach dem Austausch der Alkali- und Erdalkalitionen durch Ammoniumionen, liegen DNA und Primer als Polyanionen vor. Als nächster Schritt folgte die Messung der Extensionsprodukte.

### 2.5.5.2 Maldi-TOF-Messung

Zunächst muss der Analyt auf einem geeigneten Probenträger mit der Matrix vereinigt werden. Dazu wird das Analytengemisch mit dem Nanodispenser auf den mit Matrix präparierten Chip aufgetragen. Die Oberfläche der Chips besteht aus Silizium. Auf dieser ist punktförmig mit der organischen Säure 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA) die 384er Matrix aufgetragen. Dabei erfolgt eine Kokristallisation von Matrix und Analyt, eine notwendige Voraussetzung für die MALDI-Massenspektrometrie (Karas et al. 1988). Denn über die elektronische Anregung der Elektronensysteme der Matrixmoleküle via Laserimpuls kann die zur Ionisation der Matrixmoleküle notwendige Energie eingekoppelt werden, die die Voraussetzung für die spätere Ionisation der Analytmoleküle darstellt (Ehring et al. 1996). Zur Kontrolle der anschließenden Messung im Sinne einer Kalibrierung des Analysesystems werden auf die 384er Matrix zusätzlich Kalibranden (3-Punkt-Kalibrand) aufgebracht, die aus einer Mischung von Oligonukleotiden bekannter Masse bestehen. Anhand dieser drei Massen wird das Massenspektrometer kalibriert.

Über eine Vakuumschleuse werden die vorbereiteten Chips auf Probenträgern (Spectro Target) in das Hochvakuumssystem des Massenspektrometers (ca.  $10^{-8}$  mbar bis  $10^{-6}$  mbar) eingebracht. Dort erfolgt über eine Optik ein intensiver kurzer Laserpuls von wenigen Nanosekunden Dauer ( $N_2$ -Laser:  $\lambda=337\text{nm}$ ,  $t=3\text{-}5\text{ns}$ ). Durch den Laserbeschuss werden zunächst die Matrix-Moleküle und als Folge auch die Analytmoleküle ionisiert, die dann in die Gasphase freigesetzt werden. Dabei bewirken die photoionisierten Matrixmoleküle durch den Prozess des Protonentransfers eine hohe Ausbeute an elektrisch geladenen Analytmolekülen (Scott et al. 1995). Als Folge der Laserdesorption und Ionisation im Rahmen des MALDI-Prozesses liegen am Ende

einfach geladene Analytmolekül-Ionen vor, die in die Gasphase des Hochvakuumsystems übertreten. Diese Ionen werden anschließend in einem elektrostatischen Feld beschleunigt und über eine feldfreie Driftstrecke (Flugrohr), in dem sie abhängig vom Masse-/Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) aufgetrennt werden, auf den Detektor gelenkt. Gemessen wird die Zeit zwischen Laserbeschuss und Auftreffen auf den Detektor. Dabei bewegen sich Ionen mit hohen  $m/z$ -Werten langsamer durch das Flugrohr und treffen somit auch später am Detektor auf als Ionen mit niedrigeren  $m/z$ -Werten. Da die in der Extensionsreaktion erzeugten DNA-Fragmente je nach angehängter Nukleobase (Adenin (A), Thymin (T), Cytosin (C) und Guanin (G)) eine unterschiedliche ganz spezifische Masse haben, können sie anhand ihrer jeweiligen Flugdauer mittels der TYPER Analyzer 3.3.0 Software einem ganz spezifischen Genotyp zugeordnet werden.

## 2.6 Statistische Auswertung

Bei der statistischen Auswertung wurde für die Berechnungen zu Allel- und Genotypverteilungen der sechs oben beschriebenen genetischen Marker die Statistiksoftware Statistical Package for Social Sciences (SPSS 14.0; Inc. Chicago, 2007) verwendet.

Im Mittelpunkt standen die Unterschiede in der Allel- und Genotypverteilung zwischen Patienten und Kontrollen im Rahmen der durchgeführten Assoziationsstudie. Ziel war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen den genetischen Polymorphismen und einer Erkrankung an Schizophrenie zu untersuchen und mittels statistischer Verfahren das Signifikanzniveau einer möglichen Assoziation zu berechnen.

Die Validität der Ergebnisse wurden dabei mittels des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts (HWE) getestet, das Auskunft darüber gibt, ob die erwarteten Genotypfrequenzen eingehalten werden. Das HWE ist ein Begriff aus der Populationsgenetik. Zugrunde gelegt wird diesem mathematischen Modell eine ideale Population, in der sich weder die Häufigkeiten der Allele, noch die der Genotypen verändern, da sich diese in einem modellierten Gleichgewicht befinden. Das HWE wurde jeweils mit dem Fisher's Exact Test überprüft. Als Grenzwerte für die Erfüllung des HWE wurde

ein p-Wert von  $\geq 0,05$  festgelegt, der in diesem Fall dafür spricht, dass es keine signifikante Abweichung der berechneten Genotypverteilungen vom erwarteten Hardy-Weinberg-Gleichgewicht gibt.

Mögliche Assoziationen mit Schizophrenie der einzelnen SNPs, die die Qualitätskriterien des HWE erfüllten, wurden ebenfalls mit dem *Fisher's Exact Test* überprüft. Der *Fishers Exact Test* ist ein Signifikanztest auf Unabhängigkeit in der Kontingenztafel und hat den Vorteil, keine Voraussetzungen an den Stichprobenumfang zu stellen und auch bei einer geringen Anzahl von Beobachtungen, d.h. bei Einzelhäufigkeiten  $< 5$ , zuverlässige Resultate zu liefern. Als Grenzwert für das Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von  $p < 0,05$  festgelegt. Ein p-Wert von  $p < 0,1$  wurde als Trend gewertet.

### 3 Ergebnisse

Die sechs in dieser Arbeit untersuchten genetischen Marker rs1047631, rs2056943, rs3213207, rs1011313, rs2619522 und rs2619538 sind im 140kb großen DTNBP1-Gen lokalisiert, welches sich auf dem Chromosom 6 (6p24-21) befindet (s. Abb. 2.5, S. 58). Zur Überprüfung einer Assoziation der Genotyp- bzw. Allelverteilung mit Schizophrenie wurden die sechs Einzelmarker an 503 kaukasischen Patienten mit schizophrener Störung (65,4% Männer, 34,6% Frauen) und 1290 gesunden Personen (45,4% Männer, 54,6% Frauen) als Kontrollgruppe mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie bezüglich der Marker genotypisiert. Die als valide beurteilten Genotypen wurden hinsichtlich signifikanter Unterschiede in den Allel- und Genotypfrequenzen analysiert. Dabei wurde der Hypothese eines Einflusses von genetischen Komponenten in der Ätiologie der Schizophrenie dadurch Rechnung getragen, dass die Patientengruppe noch einmal unterteilt wurde. Weil nahe Verwandte schizophrener Patienten ein deutlich erhöhtes Risiko tragen, ebenfalls an Schizophrenie zu erkranken (Tandon et al. 2008), wurden insgesamt vier Patientenuntergruppen gebildet, die sich in der Familienanamnese unterschieden. Sie wurden jeweils separat hinsichtlich signifikanter Unterschiede in der Allel- und Genotypverteilung analysiert:

Gruppe 1 (Gesamt): Patienten gesamt

Gruppe 2 (P\_P): Patienten mit psychiatrischen Störungen in der Familie

Gruppe 3 (P\_S): Patienten mit schizophrenen Störungen in der Familie

Gruppe 4 (P\_E): Patienten mit schizophrener Störung bei Erstgrad-Familienangehörigen

#### 3.1 Prüfung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts

Die Genotypen der sechs Basenaustauschpolymorphismen wurden auf das Vorliegen des HWE getestet. Dabei zeigte sich, dass alle in dieser Arbeit untersuchten SNPs in allen vier Patientengruppen und in der Kontrollgruppe das HWE-Kriterium  $p > 0,05$  erfüllten und damit im Bereich der nach dem HWE erwarteten Verteilungen lagen (Tab 3.1, S. 70).



## Ergebnisse

**Tabelle 3.1.: Prüfung der Genotypverteilungen Patienten und Kontrolle auf HWE**

SNP	Allele		HWE (p-Wert (F))					
	A1	A2	Kontrollen	Patienten	P_P	P_S	P_E	Gesamt
rs1047631	G	A	0,581 (0,016)	0,246 (-0,058)	0,555 (-0,044)	0,249 (-0,117)	0,730 (-0,083)	0,927 (-0,005)
rs2056943	G	A	0,511 (-0,028)	0,520 (0,015)	1,000 (-0,037)	1,000 (-0,032)	01,000 (-0,021)	0,769 (-0,017)
rs3213207	G	A	0,496 (0,020)	0,233 (-0,060)	0,237 (-0,071)	0,076 (-0,168)	0,350 (-0,150)	1,000 (-0,004)
rs1011313	A	G	0,182 (0,038)	0,568 (-0,045)	0,755 (-0,038)	1,000 (-0,075)	1,000 (-0,067)	0,431 (0,018)
rs2619522	G	T	1,000 (0,001)	0,107 (-0,075)	0,125 (-0,084)	0,087 (-0,161)	0,387 (-0,109)	0,422 (-0,021)
rs2619538	A	T	0,631 (-0,016)	1,000 (0,003)	0,595 (-0,032)	0,124 (-0,137)	0,200 (-0,143)	0,702 (-0,010)

A1=selteneres Allel, A2=häufigeres Allel, HWE (p-Wert), F=inbreeding coefficient, P\_P=Patienten mit psychiatrischen Störungen in der Familie, P\_S=Patienten mit schizophrenen Störungen in der Familie, P\_E=Patienten mit schizophrener Störung bei Erstgrad-Familienangehörigen, Gesamt=Patienten und Kontrollen

## 3.2 Ergebnisse der untersuchten SNPs im DTNBP1-Gen

### 3.2.1 Genotypverteilungen

Um Hinweise zu erhalten, ob die in dieser Arbeit ausgewählten Marker im DTNBP1-Gen mit Schizophrenie assoziiert sind, wurden die ermittelten Genotypen der einzelnen Patientengruppen mit denen der Kontrollen verglichen.

**Tabelle 3.2.1: Genotypverteilung Patienten vs. Kontrollen**

			Patienten (%)			Kontrollen (%)			
SNP	A1	A2	G1	G2	G3	G1	G2	G3	p-Wert
rs1047631	G	A	9 (1,79)	143 (28,49)	350 (69,72)	31 (2,41)	320 (24,82)	936 (72,73)	0,104
rs2056943	G	A	1 (0,20)	36 (7,23)	461 (92,57)	1 (0,08)	112 (8,72)	1171 (91,20)	0,248
rs3213207	G	A	5 (1,03)	117 (24,07)	364 (74,90)	20 (1,61)	255 (20,47)	971 (77,93)	0,326
rs1011313	A	G	2 (0,40)	83 (16,63)	414 (82,97)	19 (1,49)	233 (18,23)	1026 (80,28)	0,292
rs2619522	G	T	16 (3,19)	179 (35,73)	306 (61,08)	52 (4,05)	412 (32,11)	819 (63,84)	0,657
rs2619538	A	T	95 (18,92)	246 (49,00)	161 (32,07)	256 (20%)	648 (50,27)	385 (29,87)	0,208

Die Genotypen ergeben sich aus den Allelkombinationen: homozygot Allel1 (A1/A1)=G1, heterozygot Allel1 und Allel2 (A1/A2)=G2, homozygot Allel2 (A2/A2)=G3. A1=seltteres Allel, A2 häufigeres Allel.

## Ergebnisse

**Tabelle 3.2.2: Genotypverteilung Patienten mit psychiatrischen Störungen in der Familie vs. Kontrollen**

			Patienten (P_P) (%)			Kontrollen (%)			
SNP	A1	A2	G1	G2	G3	G1	G2	G3	p-Wert
rs1047631	G	A	7 (1,91)	102 (27,79)	258 (70,30)	31 (2,41)	320 (24,82)	936 (72,73)	0,104
rs2056943	G	A	0 (0%)	26 (7,10%)	340 (92,90)	1 (0,08)	112 (8,72)	1171 (91,20)	0,248
rs3213207	G	A	3 (0,84)	85 (23,88)	268 (75,28)	20 (1,61)	255 (20,47)	971 (77,93)	0,326
rs1011313	A	G	2 (0,55)	64 (17,58)	298 (81,87)	19 (1,49)	233 (18,23)	1026 (80,28)	0,292
rs2619522	G	T	12 (3,27)	135 (36,79)	220 (59,94)	52 (4,05)	412 (32,11)	819 (63,84)	0,657
rs2619538	A	T	66 (17,98)	186 (50,68)	115 (31,34)	256 (19,86)	648 (50,27)	385 (29,87)	0,208

Die Genotypen ergeben sich aus den Allelkombinationen: homozygot Allel1 (A1/A1)=G1, heterozygot Allel1 und Allel2 (A1/A2)=G2, homozygot Allel2 (A2/A2)=G3. A1=seltteres Allel, A2 häufigeres Allel.

Wie aus den Tabellen 3.2.1 ( S. 70) und 3.2.2 ersichtlich, war im Vergleich zur Kontrollgruppe weder im gesamten Patientenkollektiv, noch in der Patientengruppe mit psychiatrischen Störungen in der Familie, einer der untersuchten SNPs bezüglich der individuellen Genotypen der Stichprobe mit Schizophrenie assoziiert.

**Tabelle 3.2.3: Genotypverteilung Pat. mit schizoph. Störungen in der Familie vs. Kontrollen**

			Patienten (P_S) (%)			Kontrollen (%)			
SNP	A1	A2	G1	G2	G3	G1	G2	G3	p-Wert
rs1047631	G	A	2 (1,36)	47 (32,19)	97 (66,44)	31 (2,41)	320 (24,86)	936 (72,73)	0,153
rs2056943	G	A	0 (0)	9 (6,21)	136 (93,79)	1 (0,08)	112 (8,72)	1171 (91,20)	0,414
rs3213207	G	A	0 (0)	40 (28,78)	99 (71,22)	20 (1,61)	255 (20,47)	971 (77,93)	0,034
rs1011313	A	G	0 (0)	20 (13,89)	124 (86,11)	19 (1,49)	233 (18,23)	1026 (80,28)	0,144
rs2619522	G	T	3 (2,05)	58 (39,73)	85 (58,22)	52 (4,05)	412 (32,11)	819 (63,84)	0,130
rs2619538	A	T	20 (13,79)	80 (55,17)	45 (31,03)	256 (19,86)	648 (50,27)	385 (29,87)	0,204

Die Genotypen ergeben sich aus den Allelkombinationen: homozygot Allel1 (A1/A1)=G1, heterozygot Allel1 und Allel2 (A1/A2)=G2, homozygot Allel2 (A2/A2)=G3. A1=seltteres Allel, A2 häufigeres Allel.

## Ergebnisse

In der Gruppe der Patienten schizophrenen Störungen in der Familie zeigt sich ein signifikantes Ergebnis beim Marker rs3213207. Hier weist der p-Wert von 0,034 auf eine Assoziation mit Schizophrenie hin (Tab. 3.2.3, S. 71).

Dabei fand sich der Genotyp G2 (A/G) mit 28,78% häufiger als in der Kontrollgruppe mit 20,47%. Dementsprechend traten die Genotypen G1 (A/A) und G3 (G/G) bei den Patienten mit schizophrenen Störungen in der Familie seltener auf.

**Tabelle 3.2.4: Genotypverteilung Pat. mit schizophrenen Störungen bei Erstgrad-Familienangehörigen vs. Kontrollen**

			Patienten (P_E) (%)			Kontrollen (%)			
SNP	A1	A2	G1	G2	G3	G1	G2	G3	p-Wert
rs1047631	G	A	2 (2,08)	31 (32,29)	63 (65,63)	31 (2,41)	320 (24,86)	936 (72,73)	0,104
rs2056943	G	A	0 (0)	4 (4,17)	92 (95,83)	1 (0,08)	112 (8,72)	1171 (91,20)	0,248
rs3213207	G	A	0 (0)	24 (26,09)	68 (73,91)	20 (1,61)	255 (20,47)	971 (77,93)	0,326
rs1011313	A	G	0 (0)	12 (12,63)	83 (87,37)	19 (1,49)	233 (18,23)	1026 (80,28)	0,292
rs2619522	G	T	3 (3,13)	37 (38,54)	56 (58,33)	52 (4,05)	412 (32,11)	819 (63,84)	0,657
rs2619538	A	T	11 (11,46)	52 (54,17)	33 (34,38)	256 (19,86)	648 (50,27)	385 (29,87)	0,208

Die Genotypen ergeben sich aus den Allelkombinationen: homozygot Allel1 (A1/A1)=G1, heterozygot Allel1 und Allel2 (A1/A2)=G2, homozygot Allel2 (A2/A2)=G3. A1=selteneres Allel, A2 häufigeres Allel.

In der Gruppe der Patienten mit schizophrenen Störungen bei Erstgrad-Familienangehörigen (Tab. 3.2.4), war bei der Analyse der Genotypen der sechs untersuchten SNPs keine Assoziation oder ein Trend zu Assoziationen mit Schizophrenie festzustellen.

### 3.2.2 Allelverteilung des Gesamttallels

#### 3.2.2.1 Patienten insgesamt vs. Kontrollen

Bei der Berechnung der absoluten Verteilung der diploiden Allele im Gesamttallel zeigte im Vergleich der Gruppe aller schizophrener Patienten mit den gesunden Kontrollen nur der SNP rs1011313 einen Trend zur Assoziation mit der Erkrankung. Hier trat bei den Patienten das seltenere Allel, in diesem Fall die Base Adenin (A), mit 8,72% seltener auf als bei der gesunden Kontrollgruppe mit 10,60%. Dementsprechend kam das häufigere Allel, hier die Base Guanin, in der Patientengruppe mit 91,28% um rund 2% häufiger vor als in der Kontrollgruppe. Der p-Wert nach dem Fisher exact Test wurde mit 0,094 berechnet.

Bezüglich der anderen SNPs ergab sich, abzulesen an den p-Werten, die jeweils deutlich höher als der Grenzwert von 0,05 lagen, kein signifikanter Unterschied oder Trend in der Allel-Verteilung zwischen Kontroll- und Patientengruppe (Tab. 3.2.5).

**Tabelle 3.2.5: Allelverteilung Patienten vs. Kontrollen**

SNP	Chr.pos.	Allele		Patienten (%)		Kontrollen (%)		p-Wert
		1	2	A1	A2	A1	A2	
rs1047631	15523101	G	A	161 (16,04)	843 (83,96)	382 (14,84)	2192 (85,16)	0,378
rs2056943	15524563	G	A	38 (3,82)	958 (96,18)	114 (4,44)	2454 (95,56)	0,460
rs3213207	15628102	G	A	127 (13,07)	845 (86,93)	295 (11,84)	2197 (88,16)	0,326
rs1011313	15633432	A	G	87 (8,72)	911 (91,28)	271 (10,60)	2285 (89,40)	0,094
rs2619522	15653649	G	T	211 (21,06)	791 (78,94)	516 (20,11)	2050 (79,89)	0,548
rs2619538	15665209	A	T	436 (43,43)	568 (56,57)	1160 (45,00)	1418 (55,00)	0,410

#### 3.2.2.2 Patienten mit psychiatrischen Störungen in der Familie vs. Kontrollen

Bei den Patienten mit psychiatrischen Störungen in der Familie zeigten sich bei keinem der SNPs signifikante Unterschiede oder Trends in der Allelverteilung im Vergleich zu den Kontrollen (Tab 3.2.6, S. 74)

**Tabelle 3.2.6: Allelverteilung Pat. mit psychiatrischen Störungen in der Familie vs. Kontrollen**

SNP	Chr.pos.	Allele		Patienten (P_P) (%)		Kontrollen (%)		p-Wert
		1	2	A1	A2	A1	A2	
rs1047631	15523101	G	A	116 (15,80)	618 (84,20)	382 (14,84)	2192 (85,16))	0,520
rs2056943	15524563	G	A	26 (3,55)	706 (96,45)	114 (4,44)	2454 (95,56)	0,349
rs3213207	15628102	G	A	91 (12,78)	621 (87,22)	295 (11,84)	2197 (88,16)	0,514
rs1011313	15633432	A	G	68 (9,34)	660 (90,66)	271 (10,60)	2285 (89,40)	0,369
rs2619522	15653649	G	T	159 (21,66)	575 (78,34)	516 (20,11)	2050 (79,89)	0,378
rs2619538	15665209	A	T	318 (43,32)	416 (56,68)	1160 (45,00)	1418 (55,00)	0,424

### 3.2.2.3 Patienten mit schizophrenen Störungen in der Familie vs. Kontrollen

In dieser Patientengruppe wurde wie schon zuvor in der Gesamtgruppe ein Trend zur Assoziation in der Allelverteilung zwischen Patienten und Kontrollen beim Marker rs1011313 festgestellt (Tab. 3.2.7). Das seltenere Allel1, die Base Adenin, trat hier mit 6,94% weniger häufig auf als bei den gesunden Kontrollen, in der Adenin in 10,60% der Fälle auftrat. Dementsprechend war das häufigere Allel2, Guanin, rund 4% häufiger in der Patientengruppe. Der p-Wert wurde mit 0,052 berechnet.

**Tabelle 3.2.7: Allelverteilung Pat. mit schizophrenen Störungen in der Familie vs. Kontrollen**

SNP	Chr.pos.	Allele		Patienten (P_S) (%)		Kontrollen (%)		
		1	2	Allel1	Allel2	Allel1	Allel2	
rs1047631	15523101	G	A	51 (17,47)	241 (82,53)	382 (14,84)	2192 (85,16))	0,229
rs2056943	15524563	G	A	9 (3,10)	281 (96,90)	114 (4,44)	2454 (95,56)	0,359
rs3213207	15628102	G	A	40 (14,39)	238 (85,61)	295 (11,84)	2197 (88,16)	0,209
rs1011313	15633432	A	G	20 (6,94)	268 (93,06)	271 (10,60)	2285 (89,40)	0,052
rs2619522	15653649	G	T	64 (21,92)	228 (78,08)	516 (20,11)	2050 (79,89)	0,489
rs2619538	15665209	A	T	120 (41,38)	170 (58,62)	1160 (45,00)	1418 (55,00)	0,262

### 3.2.2.4 Patienten mit schizophrenen Störungen bei Erstgrad-Familienangehörigen vs. Kontrollen

In der Patientengruppe mit schizophrenen Störungen bei Familienangehörigen ersten Grades wurde ein Trend zur Assoziation bei der Allelverteilung zwischen den Patienten und den Kontrollen bei zwei untersuchten SNPs festgestellt (Tab. 3.2.8). Bei SNP rs1011313 trat das seltenere Allel1, die Base Adenin, mit 6,32% weniger häufig auf als bei der gesunden Kontrollgruppe mit 10,60%. Dementsprechend war das häufigere Allel2, Guanin, in der Patientengruppe 4% häufiger zu finden. Der p-Wert wurde mit 0,063 berechnet. Beim SNP rs2619538 zeigte sich mit einem p-Wert von 0,084 ein Trend zur Assoziation. Hier trat das seltenere Allel1, auch hier die Base Adenin, mit 38,54% seltener auf als bei der gesunden Kontrollgruppe mit 45%. Dementsprechend war das häufigere Allel2, die Base Thymin, in der Patientengruppe rund 6,5% häufiger zu finden.

**Tabelle 3.2.8: Allelverteilung Pat. mit schizophrenen Störungen bei Erstgrad-Familienangehörigen vs. Kontrollen**

SNP	Chr.pos.	Allele		Patienten (P_E) (%)		Kontrollen (%)		p-Wert
		1	2	A1	A2	A1	A2	
rs1047631	15523101	G	A	35 (18,23)	157 (82%)	382 (14,84)	2192 (85,16)	0,210
rs2056943	15524563	G	A	4 (2,08)	188 (97,92)	114 (4,44)	2454 (95,56)	0,139
rs3213207	15628102	G	A	24 (13,04)	160 (86,96)	295 (11,84)	2197 (88,16)	0,637
rs1011313	15633432	A	G	12 (6,32)	178 (93,68)	271 (10,60)	2285 (89,40)	0,063
rs2619522	15653649	G	T	43 (22,40)	149 (77,60)	516 (20,11)	2050 (79,89)	0,457
rs2619538	15665209	A	T	74 (38,54)	118 (61,46)	1160 (45,00)	1418 (55,00)	0,084

### 3.2.3 Untersuchung des selteneren Allels auf Dominanz

Um die Hypothese zu überprüfen, ob die Träger des selteneren Allels A1 ein erhöhtes Risiko zeigen, an Schizophrenie zu erkranken, wurden die Häufigkeiten der Träger des selteneren Allels A1 mit den entsprechenden Genotypen homozygot A1/A1 + heterozygot A1/A2 denen der Personen, die Nicht-Träger des selteneren Allels sind, also mit dem Genotyp homozygot A2/A2 gegenübergestellt.

## Ergebnisse

Die Überprüfung des dominanten Modells wurde erneut bei allen vier Patientenuntergruppen durchgeführt (Tab 3.2.9 bis 3.2.12, S. 76-77).

**Tab.3.2.9: Verteilung A1-Allelträger vs. Nicht-A1 Allelträger Patienten vs. Kontrollen**

	Allel		Patienten (%)		Kontrollen (%)		
SNP	A1	A2	A1-Träger	Nicht-A1-Träger	A1-Träger	Nicht-A1-Träger	p-Wert
rs1047631	G	A	152 (30,28)	350 (69,72)	351 (27,27)	936 (72,73)	0,219
rs2056943	G	A	37 (7,43)	461 (92,57)	113 (8,80)	1171 (91,20)	0,393
rs3213207	G	A	122 (25,10)	364 (74,90)	275 (22,07)	971 (77,93)	0,182
rs1011313	A	G	85 (17,03)	414 (82,97)	252 (19,72)	1026 (80,28)	0,202
rs2619522	G	T	195 (38,92)	306 (61,08)	464 (36,17)	819 (63,83)	0,300
rs2619538	A	T	341 (67,93)	161 (32,07)	904 (70,13)	385 (29,87)	0,361

A1-Träger=(homozygot A1/A1 + heterozygot A1/A2), Nicht-A1-Träger=(homozygot A2/A2)

**Tab.3.2.10: Verteilung A1-Allelträger vs. Nicht-A1 Allelträger bei Patienten mit psychiatrischen Störungen in der Familie vs. Kontrollen**

	Allel		Patienten (P_P) (%)		Kontrollen (%)		
SNP	A1	A2	A1-Träger	Nicht-A1-Träger	A1-Träger	Nicht-A1-Träger	p-Wert
rs1047631	G	A	109 (29,70)	258 (70,30)	351 (27,27)	936 (72,73)	0,356
rs2056943	G	A	26 (7,10)	340 (92,90)	113 (8,80)	1171 (91,20)	0,338
rs3213207	G	A	88 (24,72)	268 (75,28)	275 (22,07)	971 (77,93)	0,315
rs1011313	A	G	66 (18,13)	298 (81,87)	252 (19,72)	1026 (80,28)	0,548
rs2619522	G	T	147 (40,05)	220 (59,95)	464 (36,17)	819 (63,83)	0,178
rs2619538	A	T	252 (68,67)	115 (31,33)	904 (70,13)	385 (29,87)	0,606

A1-Träger=(homozygot A1/A1 + heterozygot A1/A2), Nicht-A1-Träger=(homozygot A2/A2)

## Ergebnisse

**Tab.3.2.11: Verteilung A1-Allelträger vs. Nicht-A1 Allelträger Patienten mit schizophrenen Störungen in der Familie vs. Kontrollen**

	Allel		Patienten (P_S)(%)		Kontrollen (%)		
SNP	A1	A2	A1-Träger	Nicht-A1-Träger	A1-Träger	Nicht-A1-Träger	p-Wert
rs1047631	G	A	49 (33,56)	97 (66,44)	351 (27,27)	936 (72,73)	0,119
rs2056943	G	A	9 (6,21)	136 (93,79)	113 (8,80)	1171 (91,20)	0,348
rs3213207	G	A	40 (28,78)	99 (71,22)	275 (22,07)	971 (77,93)	0,087
rs1011313	A	G	20 (13,89)	124 (86,11)	252 (19,72)	1026 (80,28)	0,095
rs2619522	G	T	61 (41,78)	85 (58,22)	464 (36,17)	819 (63,83)	0,205
rs2619538	A	T	100 (68,97)	45 (31,03%)	904 (70,13)	385 (29,87)	0,775

A1-Träger=(homozygot A1/A1 + heterozygot A1/A2), Nicht-A1-Träger=(homozygot A2/A2)

**Tab.3.2.12: Verteilung A1-Allelträger vs. Nicht-A1 Allelträger bei Patienten mit schizophrenen Störungen bei Erstgrad-Familienangehörigen vs. Kontrollen**

	Allel		Patienten (P_E) (%)		Kontrollen (%)		
SNP	A1	A2	A1-Träger	Nicht-A1-Träger	A1-Träger	Nicht-A1-Träger	p-Wert
rs1047631	G	A	33 (34,38)	63 (65,62)	351 (27,27)	936 (72,73)	0,156
rs2056943	G	A	2 (2,08)	94 (97,92)	113 (8,80)	1171 (91,20)	0,130
rs3213207	G	A	24 (26,09)	68 (73,91)	275 (22,07)	971 (77,93)	0,366
rs1011313	A	G	12 (12,63)	83 (87,37)	252 (19,72)	1026 (80,28)	0,105
rs2619522	G	T	40 (41,67)	56 (58,33)	464 (36,17)	819 (63,83)	0,323
rs2619538	A	T	63 (65,63)	33 (34,37)	904 (70,13)	385 (29,87)	0,358

A1-Träger=(homozygot A1/A1 + heterozygot A1/A2), Nicht-A1-Träger=(homozygot A2/A2)



## Ergebnisse

Wie die Daten zeigen, wurde in der Patientengruppe mit schizophrenen Störungen in der Familie bei zwei SNPs jeweils ein Trend zur Assoziation zur Schizophrenie festgestellt. (Tab. 3.2.11 S.77). So lag beim SNP rs3213207 bei den Patienten der Anteil der A1-Allelträger (G/G und A/G) mit 28,78% höher als in der Kontrollgruppe mit 22,07%. Dementsprechend trat die Gruppe der homozygoten Form A2/A2 (A/A) mit 71,22% weniger oft auf als in der Kontrollgruppe mit 77,93%. Der p-Wert wurde mit 0,087 berechnet. Der SNP rs1011313 zeigte mit einem p-Wert von 0,095 einen Trend zur Assoziation mit Schizophrenie. Der Anteil der Träger des selteneren A1-Allels (A) lag mit 13,89% deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe mit 19,72%. Dementsprechend waren die Nicht-A1-Allelträger A2/A2 mit 86,11% häufiger zu finden als in der Kontrollgruppe, wo der Genotyp A2/A2 zu 80,28% aufgetreten war.

### 3.2.4 Untersuchung des selteneren Allels auf Rezessivität

In einer weiteren Berechnung wurden Träger des selteneren Allels A1 in der homozygoten Form d.h. dem Genotyp A1/A1 (d.h. die Nicht A2-Allelträger) mit den Trägern des häufigeren Allels A2 mit den entsprechenden Genotypen A1/A2 und A2/A2 verglichen. Damit sollte die Frage beantwortet werden, ob das seltenere Allel bei einem angenommenen rezessiven Vererbungsmodus mit Schizophrenie assoziiert sein könnte. Die Überprüfung des rezessiven Modells wurde bei allen vier Patientenuntergruppen durchgeführt (Tab. 3.2.13 bis 3.2.16, S.78-80).

**Tab.3.2.13: Verteilung Nicht-A2-Allelträger vs. A2-Allel-Träger bei Patienten vs. Kontrollen**

	Allel		Patienten (%)		Kontrollen (%)		
SNP	A1	A2	Nicht-A2-Träger	A2-Träger	Nicht-A2-Träger	N2-Träger	p-Wert
rs1047631	G	A	9 (1,79)	493 (98,21)	31 (2,41)	1256 (97,59)	0,482
rs2056943	G	A	1 (0,20)	497 (99,80)	1 (0,08)	1256 (99,92)	0,481
rs3213207	G	A	5 (1,03)	481 (98,97)	20 (2,61)	1226 (97,39)	0,502
rs1011313	A	G	2 (0,40)	497 (99,60)	19 (1,49)	1259 (98,51)	0,084
rs2619522	G	T	16 (3,19)	485 (96,81)	52 (4,05)	1231 (95,95)	0,491
rs2619538	A	T	95 (18,92)	407 (81,08)	256 (19,86)	1033 (80,14)	0,691

Nicht-A2-Träger=(homozygot A1/A1) A2-Träger=(heterozygot A1/A2 und homozygot A2/A2)

## Ergebnisse

SNP rs1011313 weist im gesamten Patientenkollektiv einen Trend zur Assoziation mit einem p-Wert von 0,084 auf (s. Tab. 3.2.13, S. 78). Der Anteil der Nicht-Allel2-Träger bzw. der homozygoten Allelträger des selteneren Allels A1, hier Adenin, liegt in der Patientengruppe bei nahe 0% und damit niedriger im Vergleich zu den Kontrollen, die zu 1,5% homozygote A1-Allelträger waren.

**Tab.3.2.14: Verteilung Nicht-A2-Allelträger vs. A2-Allel-Träger bei Patienten mit psychischen Störungen in der Familie vs. Kontrollen**

	Allel		Patienten (P_P) (%)		Kontrollen (%)		
SNP	A1	A2	Nicht-A2-Träger	A2-Träger	Nicht-A2-Träger	N2-Träger	p-Wert
rs1047631	G	A	7 (1,91)	360 (98,09)	31 (2,41)	1256 (97,59)	0,695
rs2056943	G	A	0 (0)	366 (100)	1 (0,08)	1256 (99,92)	1,000
rs3213207	G	A	3 (0,84)	353 (99,16)	20 (2,61)	1226 (97,39)	0,447
rs1011313	A	G	2 (0,55)	362 (99,45)	19 (1,49)	1259 (98,51)	0,195
rs2619522	G	T	12 (3,27)	355 (96,73%)	52 (4,05)	1231 (95,95)	0,544
rs2619538	A	T	66 (17,98)	301 (82,02)	256 (19,86)	1033 (80,14)	0,455

Nicht-A2-Träger=(homozygot A1/A1) A2-Träger=(heterozygot A1/A2 und homozygot A2/A2)

In der Gruppe der Patienten mit psychischen Störungen in der Familie zeigt sich bei keinem der untersuchten SNPs eine Assoziation oder ein Trend zur Assoziation mit Schizophrenie (s. Tab 3.2.14).

In der Gruppe der Patienten mit schizophrenen Störungen in der Familie, zeigte der Marker rs2619538 ein Trend zur Assoziation mit einem p-Wert von 0,095 (s. Tab. 3.2.15, S. 80). Der Anteil der Nicht-Allel2-Träger bzw. der homozygoten Allelträger des selteneren Allels A1 (hier Adenin) lag hier mit 13,79% niedriger im Vergleich zu den Kontrollen, die zu 19,86% homozygote A1-Allelträger waren.

## Ergebnisse

**Tab.3.2.15: Verteilung Nicht-A2-Allelträger vs. A2-Allel-Träger bei Patienten mit schizophrenen Störungen in der Familie vs. Kontrollen**

SNP	Allel		Patienten (P_S) (%)		Kontrollen (%)		p-Wert
	A1	A2	Nicht-A2-Träger	A2-Träger	Nicht-A2-Träger	N2-Träger	
rs1047631	G	A	2 (1,37)	144 (98,63)	31 (2,41)	1256 (97,59)	0,570
rs2056943	G	A	0 (0)	145 (100)	1 (0,08)	1256 (99,92)	1,000
rs3213207	G	A	0 (0)	139 (100)	20 (2,61)	1226 (97,39)	0,252
rs1011313	A	G	0 (0)	144 (100)	19 (1,49)	1259 (98,51)	0,247
rs2619522	G	T	3 (2,05)	143 (97,95)	52 (4,05)	1231 (95,95)	0,360
rs2619538	A	T	20 (13,79)	125 (86,21)	256 (19,86)	1033 (80,14)	0.095

Nicht-A2-Träger=(homozygot A1/A1) A2-Träger=(heterozygot A1/A2 und homozygot A2/A2)

**Tab.3.2.16: Verteilung Nicht-A2-Allelträger vs. A2-Allel-Träger bei Patienten mit schizophrenen Störungen bei Erstgrad-Familienangehörigen vs. Kontrollen**

SNP	Allel		Patienten (P_E) (%)		Kontrollen (%)		p-Wert
	A1	A2	Nicht-A2-Träger	A2-Träger	Nicht-A2-Träger	N2-Träger	
rs1047631	G	A	2 (2,08)	94 (97,92)	31 (2,41)	1256 (97,59)	1,000
rs2056943	G	A	0 (0)	96 (100)	1 (0,08)	1256 (99,92)	1,000
rs3213207	G	A	0 (0)	92 (100)	20 (2,61)	1226 (97,39)	0,392
rs1011313	A	G	0 (0%)	95 (100%)	19 (1,49)	1259 (98,51)	0,637
rs2619522	G	T	3 (3,13)	93 (96,87)	52 (4,05)	1231 (95,95)	1,000
rs2619538	A	T	11 (11,46)	85 (88,54)	256 (19,86)	1033 (80,14)	0.044

Nicht-A2-Träger=(homozygot A1/A1) A2-Träger=(heterozygot A1/A2 und homozygot A2/A2)

In der Gruppe der Patienten mit schizophrenen Störungen bei Erstgrad-Familienangehörigen zeigte sich der SNP rs2619538 mit einem p-Wert von 0,044

## Ergebnisse

signifikant mit Schizophrenie assoziiert (s. Tab. 3.2.16, S. 80). Der Anteil der Nicht-Allel2-Träger bzw. der homozygoten Träger des selteneren Allels A1 (hier Adenin) lag mit 11,46% niedriger im Vergleich zu den Kontrollen mit einem Anteil von 19,86%.

### 3.2.5 Zusammenfassung der Einzelergebnisse

Insgesamt zeigten sich bei drei der sechs untersuchten Marker in verschiedenen Patientengruppen Hinweise auf eine Assoziation mit Schizophrenie (s. Tab 3.2.17).

**Tab. 3.2.17 Ergebnisse im Überblick**

SNP	P_gesamt	P_P	P_S	P_E
<b>rs3213207</b>	—	—	<b>Genotypfrequenz:</b> heterozygot (GA) häufiger als bei Kontrollen <b>p=0,034 +++</b>  <b>A1-Träger:</b> GG+GA häufiger als bei Kontrollen <b>p=0,087 (+)</b>	—
<b>rs1011313</b>	<b>Gesamtallel:</b> Allel G seltener bei Kon- trollen <b>p=0,094 (+)</b>  <b>A2-Träger:</b> G-Allelträger (GA+GG) seltener bei Kontrollen <b>p=0,084 (+)</b>	—	<b>Gesamtallel:</b> Allel G seltener bei Kontrol- len <b>p=0,052 (+)</b>  <b>A1-Träger:</b> A-Allelträger (GA+AA) häufi- ger bei Kontrollen <b>p=0,095 (+)</b>	<b>Gesamtallel:</b> Allel G seltener bei Kon- trollen <b>p=0,063 (+)</b>
<b>rs2619538</b>	—	—	<b>A2-Träger:</b> T-Allelträger (AT+TT)) selte- ner bei Kontrollen <b>p=0,095 (+)</b>	<b>Gesamtallel:</b> Allel T seltener bei Kon- trollen <b>p=0,084 (+)</b>  <b>A2-Träger:</b> T-Allelträger (AT+TT)seltener bei Kontrollen <b>p=0,044 +++</b>

Assoziation: **+++**; Trend zur Assoziation: **(+)**; keine Assoziation: **-**  
A1=selteneres Allel, A2= häufigeres Allel

#### **rs3213207:**

Der SNP rs3213207 zeigte sich in der Subgruppe der Patienten mit schizophrenen Störungen in der Familie (P\_S) assoziiert mit Schizophrenie. Dort kam der heterozygote Genotyp GA signifikant häufiger vor als in der Kontrollgruppe (0,034). Zusätzlich konnte ein Trend zu einem häufigeren Auftreten von G-Allelträgern (GG+GA) in dieser Patientengruppe identifiziert werden (p=0,087).

### **rs1011313:**

Insgesamt fand sich bei SNP rs1011313\_sowohl in der Gesamt-Patientengruppe als in den Subgruppen mit zunehmend positiver Familienanamnese für Schizophrenie das G- Allel seltener in der Kontrollgruppe (Gesamt-Patientengruppe:  $p = 0,094$ , Gruppe P\_S:  $p = 0,052$ , Gruppe P\_E:  $p = 0,063$ ).

Träger des G-Allels (GG/AG/GA) waren in der Gesamtpatientengruppe häufiger als bei Kontrollen. Hier gab es einen Trend zur Assoziation Signifikanz bei einem p-Wert von 0,084.

In der Patientengruppe mit positiver Familienanamnese für Schizophrenie (P\_S) waren Träger des selteneren Allels A1 (A) mit den entsprechenden Genotypen AA/AG/GA seltener als in der Kontrollgruppe. Der p-Wert von 0,095 zeigt einen Trend zu Assoziation.

### **rs2619538:**

In der Subgruppe der Patienten mit schizophrenen Störungen in der Familie (P\_S) zeigten sich Genotypen mit dem häufigeren Allel A2 (TT/TA/AT) häufiger als bei der Kontrollgruppe. Der Wert von  $p = 0,095$  zeigt einen Trend zur Assoziation.

Dieses Ergebnis wurde bei zunehmendem Verwandtschaftsgrad bestätigt. So zeigte auch in der Patientengruppe mit schizophrenen Störungen bei Erstgrad-Familienangehörigen (P\_E) ein signifikant höherer Anteil von A2-Allelträgern mit den entsprechenden Genotypen TT/TA/AT im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der  $p = 0,044$ ). Zusätzlich trat hier in der Gesamtelverteilung das T-Allel häufiger auf als bei den Kontrollen ( $p = 0,084$ ).

Bei den SNPs rs1047631, rs2056943 und rs2619522 ergaben sich in der hier untersuchten Stichprobe keine Hinweise auf eine Assoziation mit Schizophrenie.

## 4 Diskussion

### 4.1 Überblick

Zielsetzung dieser Studie war es, in einer Fall-Kontroll-Studie genetische Variationen im Dysbindin-1-Gen, die zum Teil bereits zuvor in der Literatur signifikante Assoziationshinweise gezeigt hatten, an einem kaukasischen Kollektiv zu replizieren. In zahlreichen Vorgängerstudien wurden im Bereich von DTNBP1 signifikante Kopplungen und Assoziationen beschrieben. So bestehen Publikationen zufolge zwischen Patienten- und Kontrollgruppen teilweise signifikante Differenzen in den Allel- und Genotypverteilungen einiger der auch in dieser Arbeit untersuchten Einzelmarker (Straub et al. 2002b; van den Oord et al. 2003; Schwab et al. 2003; Morris et al. 2003; van den Bogaert et al. 2003; Tang et al. 2003; Kirov et al. 2004; Williams et al. 2004; Numakawa et al. 2004; Funke et al. 2004; De Luca et al. 2005; Duan et al. 2007; Riley et al. 2009 und Voisey et al. 2010).

Gleichzeitig sollte in der vorliegenden Assoziationsstudie die mögliche Bedeutung einer positiven Familienanamnese analysiert werden. Dem wurde durch die Bildung von vier Patientenuntergruppen Rechnung getragen.

Es wurden sechs SNPs an 503 schizophrenen Patienten und 1290 gesunden Kontrollpersonen genotypisiert. Damit liegt die Größe der Stichprobe dieser Arbeit im Vergleich mit den meisten Vorgängerstudien im oberen Bereich. Insgesamt überspannten die sechs untersuchten genetischen Marker rs1047631, rs2056943, rs3213207, rs1011313, rs2619522 und rs2619538 das gesamte DTNBP1-Gen vom 5'- bis zum 3'-Ende (Abb. 2.5, S. 58).

Vier der untersuchten SNPs liegen in intronischen Bereichen des Gens, der SNP rs1047631 am 3'-Ende im Intron9, die SNPs rs3213207, rs1011313 und rs2619522 liegen in den Introns1 und 4. Ein SNP, rs2619538, ist außerhalb des Gens in der putativen Promotorregion des Gens am 5'-Ende lokalisiert und ein SNP, rs2056943, im untranslatierenden Bereich des Exons9.

SNPs in intronischen Bereichen des Gens können als Folge zu alternativem Spleißen führen, neue Spleißvarianten schaffen, die mRNA in ihrer Stabilität beeinflussen oder sich auf ihre Expression auswirken. Zudem könnten intronische SNPs zu veränderter Bindung an den Transkriptionsfaktoren führen oder aber über veränderte DNA-Methylierung die Genexpression verändern. Über solche möglichen regulatorischen Funktionen intronischer Bereiche könnten auch Phänotypen beeinflusst werden (Wray et al. 2003). Das würde bedeuten, dass ein Phänotyp nicht nur von den tatsächlich proteinkodierenden Bereichen des Genoms abhängt. Zudem könnten intronisch lokalisierte SNPs insofern mit Schizophrenie assoziiert sein, als dass sie im Kopplungsungleichgewicht mit einer echten funktionellen Variante liegen, die dann ihrerseits direkt auf die Pathogenese Einfluss nehmen könnte.

SNPs im Bereich des Promotors könnten die Transkriptionsaktivität des Gens beeinflussen (Mattick und Makunin 2006). Exonische SNPs verändern, wenn sie im translatierenden Bereich liegen, direkt die Aminosäuresequenz und dadurch auch das entsprechende Genprodukt, wenn der Basenaustausch einen Aminosäuretausch zur Folge hat, der sich auf die Translation auswirkt (Seyffer 2003). Liegt der SNP im nicht-translatierenden Bereich eines Exons oder in einem nicht-translatierenden Exon, das nur in mRNA übersetzt wird, wird das Genprodukt nicht verändert, aber womöglich die mRNA beeinflusst.

Von den in dieser Arbeit untersuchten SNPs zeigten sich rs3213207, rs 1011313 und rs2619538 in jeweils unterschiedlichen Patientengruppen teilweise mit Schizophrenie assoziiert oder mit Trends zur Assoziation.

Die Marker rs1047631, rs2056943 und rs2619522 zeigten in der vorliegenden Arbeit keinerlei Hinweise auf Assoziation mit Schizophrenie.

Die höchste Signifikanz erreichte bei der Genotypverteilung mit einem p-Wert von 0,034 der SNP rs3213207 in der Gruppe der Patienten mit positiver Familienanamnese für Schizophrenie. Träger hier trat der heterozygote Genotyp A1/A2 (A/G) bei Patienten signifikant häufiger auf als die homozygoten Genotypen A/A und G/G im Vergleich zu den Kontrollen.

Der SNP rs2619538 zeigte in der Gruppe P\_E, der Patienten mit schizophrenen Störungen bei Erstgrad-Familienangehörigen, einen signifikant höheren Anteil von Trägern des häufigeren Allels A2 mit den entsprechenden Genotypen TT/TA/AT im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Anteil homozygoter Träger des selteneren Allels A1 mit dem Genotyp AA war seltener bei Patienten als bei Kontrollen. Der p-Wert von 0,044 deutet auf eine Assoziation mit Schizophrenie hin.

Auch bei den SNPs rs1011313 und rs2619538 zeigte sich in verschiedenen Patientengruppen ein höherer Anteil von A2-Allelträgern und damit ein dementsprechend niedrigerer Anteil homozygoter Träger des selteneren Allels A1 (A). Das lässt die Vermutung zu, dass eine Homozygotie des selteneren Allels A1, Adenin, bei den SNPs rs1011313 und rs2619538 nicht mit Schizophrenie einhergeht, sondern möglicherweise ein protektiver Faktor sein könnte. Im Umkehrschluss waren die Träger des häufigeren A2-Allels (G bzw. T) sowohl in der heterozygoten als auch homozygoten Form in der Patientengruppe häufiger zu finden als in der Kontrollgruppe, was das häufigere Allel A2 (G bzw. T) als Marker für die Krankheit in Verbindung bringt.

### 4.2 Überprüfung der Ergebnisse mit den HapMap-Stichproben

Der Vergleich der in dieser Arbeit gefundenen Allel- und Genotypverteilungen mit den so genannten HapMap-Stichproben des National Center for Biotechnology Information (NCBI 2014) dient der Abschätzung der Validität der Ergebnisse dieser Arbeit. Würden diese deutliche Abweichungen im Vergleich zu den HapMap-Werten zeigen, könnte dies ein Hinweis auf die eingeschränkte Gültigkeit der in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse sein.

Im HapMap-Projekt (International HapMap Consortium 2005) werden Millionen von SNPs an verschiedenen Populationen genotypisiert, mit dem Ziel, die Muster genetischer Variation des Menschen zu beschreiben, um eine Haplotyp-Karte des menschlichen Genoms erstellen zu können. Die Differenzierung zwischen unterschiedlichen Ethnien ist dabei wichtig, um Populationsstratifikationseffekte zu vermeiden. Da SNPs und Haplotypen die Folge evolutionärer Entwicklungen sind, unterscheiden sie sich in verschiedenen Ethnien zum Teil deutlich.



Beim Vergleich der Genotypverteilungen des untersuchten Kollektivs der HapMap-Stichprobe und der in vorliegenden Arbeit untersuchten Gesamtstichprobe, beide mit kaukasischem Hintergrund, zeigen sich bei allen untersuchten SNPs dieselben Verteilungen, teilweise mit leichten Abweichungen in der Spitze von knapp 10 Prozent (Tab. 4.2.1, S. 87). Die Unterschiede könnten möglicherweise mit den unterschiedlichen Stichprobengrößen der beiden Untersuchungen zusammenhängen, wobei die untersuchten HapMap-Kollektive zumeist deutlich kleiner sind als die in dieser Arbeit untersuchte Gesamtstichprobe. Zudem wurden in der HapMap-Stichprobe Familientrios untersucht, was zur Folge haben könnte, dass seltene Allele bei den HapMap-Ergebnissen stärker repräsentiert sein könnten. In der vorliegenden Arbeit hingegen bestand das Patientenkollektiv aus Nichtverwandten.

Dass Unterschiede im ethnischen Hintergrund bei den beschriebenen Abweichungen eine Rolle gespielt haben können, ist zwar möglich, aber eher unwahrscheinlich. Denn bei dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kollektiv wurden ausschließlich europäische Probanden mit kaukasischem Hintergrund ausgewählt, zum Großteil waren es deutsche Personen. Auch die Stichprobe der HapMap-Studie besteht aus Individuen mit kaukasischem Hintergrund, vor allem Amerikaner europäischen Ursprungs. Allerdings wurden in zuvor beschriebenen Studien auch schon Unterschiede bei den Ergebnissen unterschiedlicher Populationen innerhalb Europas festgestellt, z.B. bei van den Bogaert et al. (2003), die verschiedene Marker getrennt bei an Schizophrenie erkrankten Patienten eines deutschen, eines polnischen sowie eines schwedischen Kollektivs untersuchte. Nur im schwedischen Kollektiv zeigte sich der Marker rs1011313 mit einem p-Wert von 0,032 signifikant mit Schizophrenie assoziiert. Das könnte ein Hinweis daraufhin sein, dass es möglicherweise genetische Unterschiede innerhalb des kaukasischen Kollektivs geben könnte, was engere regionale Einschlusskriterien in künftigen Studien bedingen würde. Die meisten anderen Referenzstudien, wie auch die vorliegende Arbeit, unterschieden allerdings nicht innerhalb eines untersuchten kaukasischen Kollektivs.

Insgesamt lassen die Ergebnisse des Vergleichs mit der HapMap-Stichprobe den Schluss zu, dass es sich in der vorliegenden Arbeit um ein repräsentatives kaukasisches Kollektiv handelt (s. Tab. 4.2.1, S.87).

**Tab. 4.2.1: Genotypverteilung: Vergleich Gesamtstichprobe - HapMap-Stichprobe**

			Gesamtstichprobe (in Prozent)			Ges.stich- probe $\Sigma$ Indi- viduen	HapMap-Stichprobe (in Prozent)			Hap- Map $\Sigma$ Indi- viduen
SNP	A1	A2	A1/A1	A1/A2	A2/A2		A1/A1	A1/A2	A2/A2	
rs1047631	G	A	2%	26%	72%	1789	7%	27%	66%	118
rs2056943	G	A	~0%	8%	92%	1782	-	10%	90%	226
rs3213207	G	A	1%	22%	77%	1732	2%	18%	80%	226
rs1011313	A	G	1%	18%	81%	1777	-	17%	83%	226
rs2619522	G	T	4%	33%	63%	1784	4%	25%	71%	226
rs2619538	A	T	19,5%	50%	31,5%	1791	18%	41%	41%	118

HapMap-Stichprobe aus europäischem/kaukasischem Kollektiv;  
Gesamtstichprobe=Patienten und Kontrollen aus kaukasischem Kollektiv

Andere Populationen aus China, Japan und Afrika (Subsahara) zeigen bezüglich der in dieser Studie untersuchten sechs SNPs in der HapMap-Stichprobe dagegen teilweise deutlich unterschiedliche Ergebnisse im Vergleich zum kaukasischen Kollektiv. Um das zu verdeutlichen, werden die hier vorliegenden Differenzen innerhalb der HapMap-Ergebnisse bezüglich der sechs SNPs im Folgenden noch einmal analysiert (s. Tab. 4.2.2).

**Tab. 4.2.2: HapMap-Stichprobe: Populationen-Unterschiede bei untersuchten Marker**

SNP	minores Allel	MAF CEU	MAF HCB	MAF JPN	MAF YRI
rs1047631	G	20 %	2 %	0 %	17 %
rs2056943	G	5 %	0 %	0 %	0 %
rs3213207	G	5 %	1 %	0 %	2 %
rs1011313	A	8 %	24 %	13 %	3 %
rs2619522	G	17 %	7 %	7 %	41 %
rs2619538	A*	39 %	98 %	99 %	33 %

MAF=minore Allelfrequenz;

Populationen: CEU=kaukasisch-europäisch, HCB=chinesisch, JPN=japanisch, YRI=afrikanisch (Subsahara)

\* = minores Allel bei Marker rs2619538 in der chinesischen und japanischen Population abweichend (dort T-Allel)

Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Auffällig sind die Unterschiede beim SNP rs2056943, der sich allerdings in dieser Arbeit und auch in den zuvor beschriebenen Studien nicht mit Schizophrenie assoziiert gezeigt hat. Er weist sowohl im afrikanischen als auch im chinesischen und japanischen Kollektiv der HapMap-Stichprobe keinen Polymorphismus auf. Bei einer Allelfrequenz des häufigeren A-Allels von 100% bzw. des minoren Allels von 0%, liegt damit bei den Untersuchten dieser Kollektive zu 100% der Genotyp homozygot AA vor (Tab. 4.2.2, S.87).

Noch unterschiedlicher zeigen sich die Allelfrequenzen beim SNP rs2619538. Hier ist das im europäischen und afrikanischen Kollektiv häufigere T-Allel im chinesischen und japanischen Kollektiv das seltenere Allel und entsprechend das im europäischen und afrikanischen Kollektiv seltenere A-Allel im chinesischen und japanischen Kollektiv das häufigere. Bei Betrachtung der Genotyoverteilung finden sich im asiatischen Kollektiv in der HapMap-Stichprobe keinen Genotypen homozygot TT, während dieser im europäisch-kaukasischen Kollektiv in einer Frequenz von 41% und im afrikanischen (Subsahara) Kollektiv in einer Frequenz von 46% auftritt (NCBI 2014).

Der SNP rs1047631 ist im japanischen Kollektiv nicht polymorph und besteht zu 100% aus homozygoten A-Allelträgern (NCBI 2014). Auch im chinesischen Kollektiv ist das A-Allel mit 98% am häufigsten ausgeprägt. In der afrikanischen und der europäischen Gruppe kommt das A-Allel ebenfalls häufiger vor als das G-Allel. Das minore Allel findet sich mit Frequenzen um die 20 Prozent allerdings deutlich häufiger als in den anderen beiden Populationen.

Auch der SNP rs1011313 weist im Populationsvergleich teils deutliche Unterschiede auf. So sind die Frequenzen des selteneren A-Allels in den beiden asiatischen Kollektiven deutlich höher als in den beiden nicht-asiatischen Kollektiven. Der Genotyp homozygot AA kommt in der afrikanischen Population gar nicht, der Genotyp GG zu 99% vor (NCBI 2014).

Beim SNP rs2619522 ist die Anzahl der G-Allelträger und den entsprechenden in den asiatischen Populationen deutlich niedriger als in den beiden anderen. Auffällig ist die hohe Frequenz des G-Allels in der afrikanischen Gruppe mit 41 Prozent auch im Vergleich zum kaukasischen Kollektiv mit rund 17 Prozent.

Beim SNP rs3213207 zeigen sich nur kleine Unterschiede im Vergleich der asiatischen und afrikanischen Populationen mit dem kaukasischen Kollektiv.

Die hier dargestellten, teils deutlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Populationen müssen berücksichtigt werden, wenn im Folgenden die Ergebnisse dieser Arbeit vor dem Hintergrund der bisher durchgeführten Studien erörtert werden. Insgesamt lassen obige Ausführungen den Schluss zu, dass der Vergleich von Studien von Populationen asiatischer Ethnizitäten mit denen kaukasischer Ethnizitäten aufgrund der festgestellten, teilweise gravierenden Differenzen nur bedingt aussagekräftig ist. Hingegen sind Studien an kaukasischen Populationen durchaus miteinander vergleichbar, sollten aber trotzdem im Hinblick auf Populationsstratifikation kritisch betrachtet werden.

### **4.3 Vergleich der Ergebnisse mit Vorgängerstudien**

Bisher existieren mehr als 40 Kandidatengenstudien, teilweise im Fall-Kontroll-Design, teilweise familienbasiert, zu genetischen Variationen auf dem DTNBP1-Gen bei unterschiedlichen Populationen. Die Ergebnisse sind jedoch sehr inkonsistent. Teilweise konnten Assoziationshinweise repliziert werden, teilweise wichen die Ergebnisse der einzelnen Studien erheblich voneinander ab. Auch in dieser Arbeit, in welcher Einzelmarker im Hinblick auf Allel- und Genotypverteilungen vor dem Hintergrund unterschiedlicher Familienanamnesen untersucht worden sind, war das der Fall. Im Folgenden werden die hier erzielten Ergebnisse mit den Ergebnissen der wichtigsten Referenzstudien verglichen und Unterschiede wie auch Übereinstimmungen diskutiert.

#### **Straub et al. 2002/ van den Oord et al. 2003**

In einer familienbasierten Assoziationsstudie einer irischen Population mit 270 Familien, in denen Schizophrenie mit einer hohen Dichte aufgetreten war (*ISHDSF-Sample*) und insgesamt 1425 Personen, wurden insgesamt 17 SNPs untersucht, darunter drei die auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind (Straub et al. 2002b). Die größte Übereinstimmung zwischen der Studie von Straub et al. (2002) und der hier vorliegenden Arbeit zeigt der SNP rs3213207 im Hinblick auf das seltenere G-Allel. Der Marker zeigte sich in beiden Fällen assoziiert mit Schizophrenie. Auch in der zeitlich späteren Haplotyp-Analyse des gleichen Kollektivs (van den Oord et al.

2003) war der Marker rs32113207 mit dem G-Allel signifikant am gefundenen Risiko-haplotypen beteiligt. In der vorliegenden Arbeit gab der Marker in der Gruppe der Patienten mit positiver Familienanamnese für Schizophrenie einen Hinweis auf Dominanz des selteneren G-Allels ( $p=0,087$ ) und in der Genotypverteilung war der Genotyp heterozygot G/A bei den Patienten deutlich überrepräsentiert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Allerdings war das ebenfalls nur bei Patienten mit positiver Familienanamnese für Schizophrenie der Fall. Der Marker zeigte sich hier signifikant assoziiert ( $p=0,034$ ), was für den Einfluss der familiären Belastung auf das Risiko für Schizophrenie zu werten ist. Das untermauern auch die Ergebnisse von Straub et al.. Denn dort zeigte der untersuchte SNP in der vergleichbaren Gruppe D1-D8 (Patienten mit schizophrenen Angehörigen) mit einem p-Wert von 0,00004 die in der Studie am stärksten signifikante Assoziation (Straub et al. 2002b).

Übereinstimmungen zeigt auch der SNP rs1011313 im Hinblick auf das G-Allel. In der vorliegenden Arbeit zeigte er bei der Allelverteilung sowohl in der Gruppe aller untersuchten Patienten ( $p=0,094$ ) sowie in der Subgruppe der Patienten mit schizophrenen Störungen in der Familie ( $p=0,052$ ) und der Patienten mit schizophrenen Störungen bei Erstgrad-Familienangehörigen ( $p=0,063$ ) teils deutliche Trends zur Assoziation mit Schizophrenie. In allen drei Gruppen fand sich das häufigere Allel A2 (G) bei den Patienten häufiger als bei den Kontrollpersonen. Dabei zeigten die p-Werte Unterschiede in der Stärke des Assoziationssignals bei Patienten mit oder ohne positive Familienanamnese. Sie fielen in den Subgruppen P\_S ( $p=0,052$ ) und P\_E ( $p=0,063$ ) stärker aus als in der Gesamtpatientengruppe (0,094). Bei Straub et al. war der SNP rs 1011313 signifikant mit Schizophrenie assoziiert in den familiär stärker belasteten Patientengruppen D1-D8 mit an Schizophrenie erkrankten Angehörigen oder D1-D5 mit Angehörigen mit anderen psychiatrischen Erkrankungen.

Der Marker rs2619522 zeigte bei Straub keine Signifikanz. Das wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Die übrigen der hier untersuchten SNPs waren bei Straub nicht genotypisiert worden.

Die teilweise häufigeren und stärkeren Assoziationen, die die Autoren um Straub et al. und Van den Oord et al. gefunden haben, im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, könnten in einigen Punkten im unterschiedlichen Design der jeweiligen Studien begründet sein. So handelte es sich bei Straub et al. bei der Patientengruppe um Pati-

enten mit hoher familiärer Belastung mit Schizophrenie. Es wurden 270 Familien untersucht, in denen die Krankheit mit hoher Dichte aufgetreten war. Das könnte die Ergebnisse insofern beeinflusst haben, dass bestimmte Allele familienpezifisch weitergegeben wurden, daher überdurchschnittlich oft zu finden waren. Dabei könnte es sich um Häufungen oder Eigenarten in diesen speziellen Familien gehandelt haben. Möglicherweise könnten aber auch krankheitsbeeinflussende, exogene Faktoren in hochbelasteten Familien besonders ausgeprägt sein. Weiterer Unterschied zwischen den Ergebnissen von Straub et al. und Van den Oord et al. sind die unterschiedlichen Einschlusskriterien bezüglich der Patientengruppe. So wurden in der vorliegenden Arbeit lediglich Patienten eingeschlossen, die nach den Kriterien des DSM-IV eindeutig als an Schizophrenie vom paranoiden, desorganisierten, katatonen, undifferenzierten oder residualen Typus erkrankt diagnostiziert werden konnten. Dagegen schlossen Straub et al. und Van den Oord et al. auch Patienten mit schizoaffectiver Störung und teilweise auch nicht näher definierten psychiatrischen Erkrankungen ins Patientenkollektiv mit ein. Das hat möglicherweise die Ergebnisse beeinflusst. Dafür spricht, dass in jüngeren Studien die positiven Assoziationsergebnisse von Straub et al. und Van den Oord et al. so nicht bestätigt werden konnten (u.a. Turunen et al. 2006, Datta et al. 2007, Joo et al. 2007, Holliday et al. 2006, Peters et al. 2008, Sanders et al. 2008, Dutt et al. 2009 und Strohmaier et al. 2010 (s. Tab. 1.3.1, S. 46)

### **Schwab et al. 2003**

Sechs SNPs, zu denen es zum Teil bei Straub et al. positive Assoziationsergebnisse gegeben hatte, wurden in dieser Studie untersucht an einem Kollektiv von 78 Geschwisterpaar(Sib-Pair)-Familien und 125 Trios deutscher, israelischer und ungarischer Herkunft.

Auch in der Studie von Schwab et al. (2003) gibt es Übereinstimmungen mit der vorliegenden Arbeit bei den Markern rs3213207 (seltenes G-Allel) und rs1011313 (häufigeres G-Allel), die bei Schwab et al. signifikant mit Schizophrenie assoziiert waren. Bei der Haplotyp-Analyse zeigten sich die stärksten Hinweise auf Assoziation bei Kombinationen mit dem Marker rs1011313. Zudem zeigte sich der Marker rs2619522 im Hinblick auf das T-Allel assoziiert (Schwab et al. 2003), was in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Allerdings unterschied sich das Design in den beiden Studien hinsichtlich der Patientenkollektive. Während Schwab et al. eine familienbasierte Untersuchung von Trios und betroffenen Geschwisterpaaren durchführ-

ten, bestand das Patienten-Kollektiv in der vorliegenden Arbeit aus 503 nicht verwandten schizophrenen Patienten. Möglicherweise ist die Assoziation des Markers rs2619522 bei Schwab et al. damit zu begründen, dass krankheitsbeeinflussende Faktoren in hochbelasteten Familien besonders ausgeprägt sein könnten. Auf der anderen Seite könnten bestimmte Allele familienspezifisch verstärkt weitergegeben werden. Dass die Kontrollen, die bei Schwab et al. denn auch Pseudokontrollen genannt wurden, aus den Allelen bestanden, die nicht an das erste Kind weitergegeben wurden, könnte diesen Effekt noch verstärken. In der vorliegenden Studie bestand sowohl die Stichprobe als auch die Kontrollgruppe aus Nichtverwandten, wodurch der familienspezifische Effekt ausgeschlossen werden kann.

Wie auch in der vorliegenden Studie bekräftigen die Ergebnisse von Schwab et al. die Annahme, dass die Krankheitseffekte am DTNBP-1-Lokus durch eine positive Familienanamnese verstärkt werden. Denn die Assoziationen wurden bei Schwab et al. wie zuvor bei Straub et al. (2002b) und van den Oord et al. (2003) in Kollektiven von Familien mit hoher Krankheitsdichte erzielt. Auch in der vorliegenden Arbeit gab es positive Assoziationsergebnisse zumeist in den Gruppen mit positiver Familienanamnese.

### **Williams et al. 2004/ Tosato et al. 2006**

Insgesamt 20 SNP wurden von Williams et al. (2004) gentotypisiert, darunter fünf der sechs SNPs, die auch in der vorliegenden Arbeit analysiert worden sind. Das Patientenkollektiv bestand aus 219 Patienten und 231 Kontrollen irischer Herkunft (*Dublin-Sample*) sowie einer britischen Gruppe, dem *Cardiff-Sample*, bestehend aus 708 schizophrenen Patienten und 711 Kontrollen. Dabei zeigte sich im Vergleich zur vorliegenden Arbeit lediglich eine Übereinstimmung beim SNP rs2619538. Dieser bei Williams et al. erstmals untersuchte SNP zeigte dort mit dem häufigeren T-Allel und einem p-Wert von 0,06 einen Trend zur Assoziation. Dieses Ergebnis wurde später an einem italienischen Kollektiv von 80 schizophrenen Patienten und 106 Kontrollen repliziert (Tosato et al. 2006). Dabei könnte der Marker rs2619538 mit der Schwere der Erkrankung in Verbindung stehen. Tosato et al. (2006) fanden den Haplotyp rs2619538 – rs909706 signifikant mit einer schweren Ausprägung von Schizophrenie assoziiert.

Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich der SNP rs2619538 mit Schizophrenie assoziiert bzw. Trends zur Assoziation. So trat in der Gesamtelverteilung in der Gruppe P\_E das T-Allel häufiger auf als in der Kontrollgruppe ( $p=0,084$ ). Zudem fanden sich die Träger des T-Allels mit den entsprechenden Genotypen TT/TA/AT häufiger sowohl in der Patientengruppe P\_S als auch in der Patientengruppe P-E als in der Kontrollgruppe. Dabei nahm das Ergebnis an Signifikanz zu, je stärker die Familienbelastung war. So wurde in der Gruppe der P\_S, der Patienten mit schizophrenen Störungen in der Familie ein Trend zur Assoziation mit einem p-Wert von 0,095 erreicht und in der Gruppe P\_E, der Patienten mit schizophrenen Störungen bei Erstgrad-Familienangehörigen Signifikanzniveau mit  $p=0,044$ .

Der Anteil homozygoter Träger des selteneren Allels Adenin lag jeweils niedriger bei Patienten als bei den gesunden Kontrollen. Möglicherweise ist Homozygotie des selteneren Allels Adenin damit als protektiver Faktor zu werten, da die Träger des häufigeren T-Allels in den Patientengruppen häufiger zu finden waren als in der Kontrollgruppe.

Übereinstimmung zwischen Williams et al. und dieser Arbeit zeigte sich auch bei SNP rs1047631, der in beiden Untersuchungen keine Assoziationshinweise gab (Williams et al. 2004). In der folgenden Haplotyp-Analyse wurde Signifikanz für die Marker-Kombination rs2619539-rs3213207-rs2619638-rs3213207 festgestellt, die in zahlreichen Studien und auch in dieser Arbeit mit dem G-Allel signifikante Assoziationshinweise geliefert hat. Allerdings trat der Marker rs3213207 in der Studie von Williams et al. sowohl beim vermuteten protektiven Haplotyp als auch beim Risiko-haplotyp mit dem häufigeren A-Allel auf (Williams et al. 2004). Das könnte dafür sprechen, dass dem Marker wohl nur in Kombination mit anderen Faktoren Gewicht bei der Entstehung der Schizophrenie zukommt. Die Gemeinsamkeiten der Ergebnisse mit der vorliegenden Arbeit könnten dabei auch darauf zurückzuführen sein, dass es sich jeweils um Fall-Kontroll-Studien handelte und keine familienbasierte Untersuchung wie in den Studien zuvor.

### **Numakawa et al. 2004/ Tang et al. 2003/ Li et al. 2005**

In der familienbasierten Untersuchung untersuchten Tang et al. (2003) sieben SNPs in 233 chinesischen Trios, Li et al. (2005) genotypisierten insgesamt 10 SNPs in ei-



ner familienbasierten Untersuchung an einem Kollektiv von 638 hanchinesischen Trios und Numakawa et al. (2004) untersuchten insgesamt sechs SNPs an einem japanischen Kollektiv aus 670 schizophrenen Patienten und 588 Kontrollen. Vier der auch in der vorliegenden Arbeit untersuchten SNPs wurden von Numakawa et al. (2004) genotypisiert. Auffällig in die gleiche Richtung gingen dabei die Ergebnisse beim Marker rs3213207. Dort zeigten sich in beiden Analysen teils signifikante Assoziationshinweise im Hinblick auf das seltene G-Allel, die bei Numakawa einen p-Wert von 0,0013 erreichten. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit fanden Numakawa et al. beim Einzelmarker rs1011313 keine Assoziationshinweise. Allerdings wurde ein Risikohaplotyp identifiziert mit der Kombination rs3213207-rs1011313 und den Allelen G-G, die bezüglich der Allelausprägung mit jenen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten beiden Einzelmarker identisch sind (Numakawa et al. 2004).

Beim Marker rs2619522 fanden Numakawa et al. eine signifikante Assoziation bezüglich des G-Allels. In der vorliegenden Arbeit wurde kein Assoziationssignal gefunden. Der Marker rs2619538 zeigte zwar in beiden Arbeiten Signifikanzniveau, allerdings bei Numakawa et al. mit dem selteneren A-Allel (Numakawa et al. 2004) und damit genau entgegengesetzt der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und auch jener anderer Studien an kaukasischen Populationen, die das häufigere G-Allel ausgemacht hatten (Williams et al. 2004; Riley et al. 2009). Die Differenzen zwischen der Studie von Numakawa et al., dieser Arbeit und der anderer Studien an europäischen Kollektiven könnten in den unterschiedlichen Studienpopulationen begründet sein. Wie bereits in obigen Ausführungen zu den HapMap-Stichproben beschrieben, differiert der genetische Hintergrund von unterschiedlichen Populationen zum Teil deutlich. Besonders große Unterschiede weisen dabei die hier untersuchten Variationen im Vergleich zwischen den asiatischen und kaukasischen Populationen auf (HapMap). Selbst innerhalb einzelner ethnischer Gruppen sind evolutionär bedingte Unterschiede denkbar. Ein Hinweis darauf sind die teils sehr voneinander abweichenden, inkonsistenten Studienergebnisse auch innerhalb europäischer Populationen, die aber allesamt kaukasischen Ursprungs sind, wie z.B. bei Straub et al. 2002b, van den Bogaert et al. 2004; Williams et al. 2004; Kirov et al. 2004; Funke et al. 2004; Turunen et al. 2006; Tosato et al. und vielen mehr. Daher sind die Ergebnisse von Studien mit unterschiedlichem ethnischen Hintergrund nur bedingt vergleichbar. Zumindest bedarf es gründlicher Analysen bezüglich der Populationsstratifikation, um Verzerrungen bzw. falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden.

Auch die Ergebnisse der Arbeit von Tang et al. sind vor diesem Hintergrund zu beurteilen. Dort wurde ein Risikohaplotyp rs2619539–rs2919522–rs1018381–rs909706 identifiziert, der mit einem p-Wert von 0,00091 eine signifikante Assoziation mit Schizophrenie aufwies (Tang et al. 2003). In den diskutierten europäischen Kollektiven wurde ein solcher Haplotyp nicht als signifikant mit der Erkrankung assoziiert beschrieben, was im unterschiedlichen genetischen Hintergrund der beiden Populationen begründet sein könnte.

Die Studie von Li et al. zeigte, wie auch die vorliegende Arbeit, Signifikanz beim Marker rs3213207, allerdings war hier die Frequenz des A-Allels häufiger in der Patientengruppe. In der vorliegenden Arbeit und auch in den Studien von Straub et al. und van der Oord et al. war das hingegen beim G-Allel bzw. G-Allelträgern der Fall. Auch Li et al. sehen darin einen erneuten Hinweis auf den Einfluss genetischer Unterschiede verschiedener Ethnien auf die Ätiopathogenese der Schizophrenie (Li et al. 2005).

### **Kirov et al. 2004**

Wie bei Li et al. (2005) war auch bei der Untersuchung von Kirov et al. (2004) von insgesamt acht SNPs bei 488 bulgarischen Trios mit jeweils einem an Schizophrenie erkrankten Indexpatienten der Marker rs3213207 signifikant mit Schizophrenie assoziiert. Allerdings war hier wie zuvor auch bei Li et al. (2005) und im Gegensatz zu der hier vorliegenden Arbeit das A-Allel bzw. A-Allelträger bei Patienten häufiger. Bei den Ursachen für dieses differierende Resultat könnten zum einen mögliche Unterschiede in der Ethnizität eine Rolle gespielt haben, zum anderen das Studiendesign, da es sich bei der Patientengruppe ähnlich wie bei Schwab et al. um ein Kollektiv von Familien mit hoher Krankheitsdichte handelte, das womöglich genetische Marker familienspezifisch weiter gegeben hat.

### **Van den Bogaert et al. 2004**

Insgesamt fünf SNPs wurden an einem deutschen Kollektiv von 418 schizophrenen Patienten und 113 Kontrollen, einem polnischen Kollektiv von 294 Patienten und 113 Kontrollen sowie einem schwedischen Kollektiv von 142 schizophrenen Patienten und 272 Kontrollen untersucht. Gewisse Übereinstimmungen mit den Ergebnissen

der vorliegenden Arbeit wurden beim Marker rs1011313 erzielt. Hier zeigte sich bei Van den Bogaert et al. die Allelfrequenz des selteneren G-Allels bei Patienten im Vergleich zu den Kontrollen erhöht und mit einem p-Wert von 0,032 eine signifikante Assoziation zur Schizophrenie, aber nur in der schwedischen Gruppe. In der vorliegenden Arbeit wiesen die Ergebnisse in die gleiche Richtung, allerdings ergaben sich lediglich Trends zur Assoziation. Auffällig bei van den Bogaert ist die vergleichsweise kleine Fallzahl im schwedischen Kollektiv. Während die deutsche Gruppe aus 419 schizophrenen Patienten bestand und die polnische aus 294, beinhaltete die schwedische Gruppe nur 142. Es ist denkbar, dass es sich bei dem Ergebnis van den Bogaerts et al. um ein falsch-positives Ergebnis handeln könnte, da aufgrund der geringen Fallzahl der Analyse die nötige statistische Aussagekraft gefehlt hat. Daneben könnten die Resultate van den Bogaerts et al. als Hinweis für genetische Unterschiede auch innerhalb einer kaukasischen Population gewertet werden.

Die Hypothese, dass die Ergebnisse bei steigender Familienbelastung an Signifikanz gewinnen, die auch durch die Resultate der vorliegenden Arbeit gestützt werden kann, wurde durch eine zweite Analyse Van den Bogaerts et al. unterstützt. Hier wurde in der Patientengruppe mit positiver Familienanamnese ein fünf-Marker-Haplotyp bestehend aus rs3213207-rs1011313-rs2005976-rs760761-rs1018381 als signifikant mit Schizophrenie assoziiert identifiziert. Der p-Wert wurde mit 0,00009 berechnet.

### **Funke et al. 2004**

Hier wurden insgesamt sechs SNPs an drei Kollektiven unterschiedlicher ethnischer Herkunft, kaukasisch, afroamerikanisch und hispanisch, untersucht (Funke et al. 2004). Bei der kaukasischen Gruppe handelte es sich um 258 Patienten mit Schizophrenie und schizophrenieformer Störung und 467 Kontrollen, bei der afroamerikanischen um 215 Fälle und 74 Kontrollen und bei der hispanischen Gruppe um 51 Patienten und 32 Kontrollen. Zwei SNPs, die in der vorliegenden Arbeit genotypisiert wurden, waren auch in der Studie von Funke et al. Gegenstand der Betrachtung. Der Marker rs1011313, der in dieser Arbeit Trends zur Assoziation gezeigt hatte, bot in der Studie von Funke et al. kein Assoziationssignal in keiner der drei untersuchten Patientengruppen. Der Marker rs2619522, der in der vorliegenden Arbeit keinen Hinweis gegeben hatte, mit Schizophrenie assoziiert zu sein, erreichte bei Funke et

al. sowohl in der kaukasischen als auch in der hispanischen Gruppe Signifikanzniveau. Allerdings handelte es sich bei der hispanischen Gruppe lediglich um 52 Patienten, eine womöglich zu geringe Fallzahl, um genügend statistische Aussagekraft aufzuweisen. Bei der kaukasischen Gruppe greift diese Begründung nicht, denn sie umfasste zwar nur etwa halb so viele Patienten wie die Patientengruppe der vorliegenden Arbeit, war aber mit 258 Patienten mit Schizophrenie und schizophrenieformer Störung zahlenmäßig groß. Allerdings waren die diagnostischen Einschlusskriterien bei Funke et al. weiter gefasst als in der vorliegenden Arbeit. Möglicherweise könnten die inkonsistenten Ergebnisse durch den Einfluss des Genotyps auf den jeweiligen Phänotypen bedingt sein und damit Ausdruck der Vielfältigkeit der Krankheit Schizophrenie in Krankheitsbild und möglicherweise auch in seinem entsprechenden genetischem Pendant.

### **Duan et al. 2007/de Luca et al. 2005**

In der Studie von Duan et al. (2007) wurden insgesamt 26 SNPs am einem Kollektiv von 136 Familien und 646 Individuen mit der Diagnose Schizophrenie oder schizoaffektiver Störung genotypisiert, die zu 72% europäischer und zu 18% afroamerikanischer Abstammung waren (restliche 10% unbekannt). Es zeigten sich signifikante Assoziationshinweise am 3'-Ende des DTNBP1-Gen (Duan et al. 2007), allerdings nicht bei Markern, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit gewesen sind. Hier wurde die 3'-Region des DTNBP1-Gens mit zwei untersuchten SNPs, rs1047631 und rs2056943 abgedeckt, welche keine Assoziationshinweise lieferten. Duan et al. konnten in der Haplotypanalyse eine signifikante Assoziation bei der Kombination rs7758659-rs3213207 feststellen mit einem p-Wert von 0,0015 (Duan et al. 2007). Dabei handelt es sich bei dem beteiligten SNP rs3213207 um den Marker, der bislang mit am häufigsten als signifikant mit Schizophrenie assoziiert berichtet worden ist, auch in der vorliegenden Arbeit war das der Fall.

Das 3'-Ende des DTNBP1-Gens stand auch in der Studie von de Luca et al. im Fokus. Nachdem zuvor Bray et al. bei einer allelspezifischen Expressionsanalyse des SNPs rs1047631 an post mortem Hirngewebe schizophrener Patienten auf eine verminderte Expression von DTNBP1 mRNA der das A-Allel enthaltenen Variante gestoßen waren (Bray et al. 2005), analysierten de Luca et al. den SNP rs1047631 sowie zwei andere Marker in einer familienbasierten Untersuchung von 106 kaukasi-

schen, zwei afrikansichen und neun asistischen Familien. Keiner der Marker zeigte sich mit Schizophrenie assoziiert (de Luca et al. 2005), wie auch in der vorliegenden Arbeit.

### **Riley et al. 2009**

In der Assoziationsstudie von Riley et al. wurden u.a. vier der auch in der vorliegenden Arbeit betrachteten SNPs an einem irischen Kollektiv von 1021 Patienten mit Schizophrenie oder schwerer schizoaffektiver Störung und 626 Kontrollen untersucht. Übereinstimmende Ergebnisse gab es bei den Markern rs2619538 (selteneres T-Allel) sowie rs3213207 (häufigeres G-Allel), die sich bei Riley et al. signifikant mit Schizophrenie assoziiert zeigten (Riley et al. 2009) und auch in der vorliegenden Arbeit teils signifikante Assoziationen zeigten, teils Trends. Im Unterschied zu Riley et al. gab es hier eine Signifikanz beim Marker rs3213207 ( $p=0,034$ ) jedoch nur bei positiver Familienanamnese bezüglich Schizophrenie. Auch beim Marker rs2619538 verstärkten sich die Assoziationssignale mit zunehmender familiärer Belastung mit Schizophrenie. Dagegen hatten Riley et al. in einer zweite Analyse keine Unterschiede in den Assoziationssignalen im Fall positiver Familienanamnese oder auch bei unterschiedlichen Geschlechtern feststellen können (Riley et al. 2009). Das steht im Widerspruch nicht nur zu den Ergebnissen dieser Arbeit, sondern auch zu denen früherer Untersuchungen an einem irischen Kollektiv (Straub et al. 2002b) und an einem schwedischen Kollektiv (van den Bogaert et al. 2003), die ebenfalls über steigende Assoziationssignale bei positiver Familienanamnese berichtet hatten. Die unterschiedlichen Aussagen der vorliegenden Arbeit und der Arbeit von Riley et al. könnten in den unterschiedlich hohen Fallzahlen begründet liegen. Denn bei Riley et al. umfasste die Untersuchungsgruppe der Patienten mit schizophrenen Störungen bei Erstgrad-Familienangehörigen 196 Fälle. In der vorliegenden Arbeit waren die Fallzahlen geringer. So beinhaltete die Gruppe P\_S, die Patienten mit schizophrenen Störungen in der Familie, 146 Fälle, die Gruppe P\_E, die Patienten mit schizophrenen Störungen bei Erstgrad-Familienangehörigen 96 Fälle. Um hier aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen und die statistische Aussagekraft zu erhöhen, wären größere Fallzahlen von Vorteil gewesen.

Auch beim Marker rs1011313 wurden im Vergleich der beiden Arbeiten unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Während in der vorliegenden Arbeit sowohl in den Gruppen

mit als auch denen ohne positiver Familienanamnese jeweils ein Trend zur Assoziation beim häufigeren G-Allel festgestellt werden konnte, gab es bei Riley et al. keinen Hinweis auf Assoziation. Anzumerken sind dabei die unterschiedlichen Einschlusskriterien der beiden Arbeiten. Während Riley et al. sowohl Patienten mit der Diagnose Schizophrenie als auch mit schizoauffektiven Störungen nach DSM-IV in die Patientengruppe einschlossen, wurden hier nur Patienten mit der Diagnose Schizophrenie nach DSM-IV in die Patientengruppe aufgenommen. Auch hier stellt sich erneut die Frage nach der Trennschärfe der Diagnosekriterien für Schizophrenie.

### **Strohmeyer et al. 2010**

Von den bei Strohmeyer et al. genotypisierten 38 SNPs im DTNBP1-Gen an 634 Patienten mit Schizophrenie und 776 Kontrollen befanden sich mit rs1047631 und rs2056943 lediglich zwei SNPs, die auch in der vorliegenden Arbeit untersucht worden sind. Keiner der beiden am 3'-Ende des Gens gelegenen Marker zeigte einen Hinweis auf Assoziation. Auch bei einer zweiten Analyse einer Subgruppe, die aus 147 Patienten mit positiver Familienanamnese bestand, d.h. einen Verwandten ersten oder zweiten Grades mit Schizophrenie in der Familie hatten, zeigte sich kein Hinweis auf Assoziation. Auch das deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Im Übrigen konnte auch für keinen anderen der untersuchten Marker ein Assoziationssignal gefunden werden.

### **Voisey et al. 2010:**

Von den in dieser Studie untersuchten 13 SNPs an einem australischen Kollektiv von 160 schizophrenen Patienten einer nicht näher definierten Population und 250 Kontrollen war nur einer deckungsgleich mit denen in der vorliegenden Arbeit. Dabei handelte es sich um den Marker rs2056943. In beiden Arbeiten konnte hier keine Assoziation mit Schizophrenie gefunden werden. Dagegen zeigten Voisey et al. bei vier Markern eine signifikante Assoziation mit Schizophrenie, bei denen das bislang zuvor nicht der Fall gewesen war. Schwächen der Studie liegen in der geringen Fallzahl sowie in der mangelnden Populationsstratifikation, da es sich bei der Patientengruppe um ein Kollektiv von Patienten einer nicht näher definierten Population gehandelt hat.

Zahlreiche weitere Untersuchungen zu genetischen Variationen im DTNBP1-Gen zeigten keine Assoziationen bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Markern und auch nicht bei anderen untersuchten SNPs (Betcheva et al. 2009; Dutt et al. 2009; Peters et al. 2008; Sanders et al. 2008; Datta et al. 2007; Turunen et al. 2007; Joo et al. 2006). Zu dem in dieser Arbeit analysierten Marker rs2056943, der erst in jüngerer Zeit Beachtung gefunden hatte, wurde, obwohl exonisch lokalisiert, in keiner der Studien bislang ein Assoziationshinweis festgestellt. Das deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

Insgesamt könnten die Gründe für die offensichtlich divergierenden Ergebnisse der bislang beschriebenen Assoziationsstudien am DTNBP1-Gen in grundsätzlich limitierenden Faktoren bei der Erforschung genetischer Ursachen der Schizophrenie liegen, auf die im folgenden abschließend näher eingegangen werden soll.

#### 4.4 Überlegungen zu limitierenden Faktoren

Schizophrenie gehört zu den genetisch komplexen Erkrankungen mit einer breiten Variation im Krankheitsbild. Ein monogener Erbgang gilt als ausgeschlossen, vielmehr gehen viele gängige Theorien davon aus, dass zahlreiche Veränderungen in mehreren Genen in Kombination mit Umweltfaktoren an der Entstehung der Krankheit ursächlich beteiligt sind (Tandon et al. 2008; Owen 2000; Maier et al. 1999) und schließlich die vielfältigen hirnstrukturellen, neurophysiologischen und biochemischen Veränderungen und die unterschiedlichen Symptome, die bei der Schizophrenie zu finden sind, bedingen.

In der Heterogenität der Erkrankung und der vielfältigen Phänotypen könnte auch eine der Erklärungen für die widersprüchlichen Ergebnisse der bislang durchgeführten Studien am DTNBP1-Gen liegen. Die Heterogenität des Krankheitsbildes erschwert eine Zuordnung im Sinne von Genotyp-Phänotyp. So ist es durchaus denkbar, dass bestimmte Variationen im Genotyp wie SNPs oder Haplotypen auch nur bestimmte Symptomenkomplexe oder Teilaspekte der Krankheit beeinflussen, z.B. Negativ-Symptome wie die kognitive Leistungsfähigkeit (Burdick et al. 2007; Fanous et al. 2005; van den Oord 2003; Straub et al. 2003), Sprachvermögen (Luciano et al. 2009) oder Positiv-Symptome wie Wahn oder Ich-Störungen (Craddock und Owen 2007). Verschiedene Genotypen könnten also in Beziehung mit nur bestimmten Subtypen der Schizophrenie stehen, was die inkonsistenten Studienergebnisse durchaus erklären würde. Denn die bisherigen Assoziationsstudien haben zumeist nicht in einzelne Subtypen unterschieden, so wie auch die vorliegende Arbeit, und wenn doch, waren die Fallzahlen zumeist gering, was die statistische Aussagekraft verringert. Daher wird Studien zu Endophänotypen in der Untersuchung genetischer Variationen in Suszeptibilitätsgenen für Schizophrenie mit ausreichend hohen Fallzahlen künftig wohl ein großer Stellenwert zukommen.

Zudem wird auch systematischen genomweiten Assoziationsstudien mit hohen Fallzahlen mehr und mehr Bedeutung zukommen. Hier wurde aktuell eine umfangreiche Studie durchgeführt, in der das Genom von rund 37000 schizophrener Patienten im Vergleich zu rund 113000 Kontrollen detektiert wurde (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium 2014). Es zeigten sich dabei 108 unabhängige mit Schizophrenie assoziierte Gen-Loci, von denen 83 vorher nicht mit Schizo-



phrenie in Verbindung gebracht worden waren. Das Konsortium fand zudem eine kleinere Anzahl von Genen mit Schizophrenie assoziiert, die funktional der Aktivität des Immunsystems zugeordnet werden, aber es gab auch Ergebnisse, die frühere Hypothesen stützen, wie die Dopaminhypothese. So fanden die Autoren eine Assoziation zwischen Schizophrenie und der Region des Genoms, die für das *DRD2*-Gen kodiert, dem Gen also, welches für den Dopamin-Rezeptor kodiert, dessen Ziel die derzeit zugelassenen Medikamente gegen Schizophrenie sind. Das Dysbindin-1-Gen fand sich in dieser Untersuchung nicht unter den Top-Kandidaten-Genen für Schizophrenie (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium 2014).

Dass bislang nicht alle positiven Hinweise in Genomscans repliziert werden konnten, ist unter anderem auch mit der Lokus-Heterogenität zu erklären, durch die sich komplexe genetische Erkrankungen auszeichnen. Zudem ist vorstellbar, dass in unterschiedlichen Ethnien oder Untersuchungskollektiven auch unterschiedliche Krankheitsvarianten existieren. Auch sind sowohl in Kopplungsstudien als auch in Assoziationsuntersuchungen teils erhebliche Unterschiede in Stichprobengröße und diagnostischen Einschlusskriterien feststellbar (Zuo et al. 2009). Auch Unterschiede im zugrunde liegenden Vererbungsmodell könnten für Ergebnisdifferenzen sorgen. So wurden in ersten Kopplungsanalysen oft klassische Vererbungstheorien angenommen, später dann wurden vermehrt parameterfreie Methoden angewandt, die aber meist über weniger statistische Aussagekraft verfügen (Bickeböller und Fischer 2007).

Neben der Theorie, dass viele und häufige Variationen in verschiedenen Genen für sich genommen nur jeweils kleinen Effekten zur Entstehung von Schizophrenie beitragen, gibt es mittlerweile auch andere Überlegungen. So könnten auch sehr seltene, multiple, allerdings hoch penetrante Mutationen, so genannte *copy number variations* (CNV) eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Schizophrenie spielen, die möglicherweise familienspezifisch oder spezifisch für einzelne Individuen sind (Mc Clellan et al. 2007). Bislang gab es bei groß angelegten Untersuchungen von CNVs bezüglich Schizophrenie einige vielversprechende Ergebnisse (Stefanson et al. 2008; Need et al. 2009; Stefanson et al. 2009).

Auch die sogenannte „common disease -rare allele“ Hypothese legt die Vermutung zugrunde, dass Schizophrenie genetisch heterogen ist und dass viele prädisponierende Mutationen, die penetrant und individuell selten sind, möglicherweise sogar spezifisch in einzelnen Fällen oder Familien für die Erkrankung verantwortlich sein könnten (McClellan et al. 2007). In diesem Modell treten bei verschiedenen Familien spezifische Mutationen auf, im gleichen oder auch in verschiedenen Genen, aber jede Familie trägt nur eine oder zwei Mutationen. Das bedeutet, dass viele verschiedene mit der Krankheit assoziierte Mutationen im selben Gen auftreten können und würde die inkonsistenten Studienergebnisse gerade bei der Untersuchung des Dysbindin-1-Gens im Zusammenhang mit Schizophrenie erklären (McClellan et al. 2007).

Neben der Heterogenität der Schizophrenie und den möglicherweise unzureichenden Theorien, in welcher Form genetische Veränderungen Einfluss auf die Erkrankung nehmen können, gibt es auch eine Reihe von methodischen Faktoren, die Ursache für die inkonsistenten Ergebnisse sein könnten.

Das ist z.B. die Auswahl der Probanden. Diese wurde in der vorliegenden Arbeit bei der Rekrutierung der Patientengruppe äußerst restriktiv gehandhabt. Es wurden lediglich Patienten eingeschlossen, die die DSM-IV-Kriterien für Schizophrenie erfüllten. In anderen Studien wurden teilweise auch Patienten mit schizoaffektiver Störung oder dem weiteren schizophrenen Formenkreis mit eingeschlossen. Unter der Annahme, dass bestimmte Veränderungen im Genotyp bestimmte Phänotypen zur Folge haben, könnte die Heterogenität der verschiedenen Patientengruppen mit ein Grund für die teils deutlich differierenden Ergebnisse sein.

Auch die Auswahl der Kontrollpersonen stellt eine mögliche Ursache für die auseinanderdriftenden Ergebnisse dar. Gerade bei Frauen kommt es nicht selten zu einem zweiten Erkrankungsgipfel im Alter von Mitte 40. Sollten die Kontrollpatienten jünger sein, so kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie möglicherweise noch an Schizophrenie erkranken könnten. Dem wurde in der vorliegenden Arbeit Rechnung getragen. Der Altersdurchschnitt in der Kontrollgruppe lag bei 46 Jahren. Zudem sollte sowohl bei der Auswahl der Kontrollen, als auch bei der Auswahl der Patientengruppe auf eine mögliche Gleichverteilung zwischen männlichem und weiblichem Geschlecht geachtet werden, weil so mögliche geschlechtsspezifische Einflüsse minimiert werden können, wie z.B. der möglicherweise protektive Effekt von Östrogen (Häfner 1995a). Auch dieses Kriterium wurde in der hier vorliegenden Arbeit weitge-

hend erfüllt. So betrug die prozentuale Verteilung zwischen männlichen und weiblichen Teilnehmern in der Kontrollgruppe 45,4% zu 54,6%. In der Patientengruppe zeigte sich hinsichtlich der Geschlechterverteilung ein weniger ausgeglichenes Ergebnis mit 65% männlichen und rund 35% weiblichen Probanden kaukasischer Abstammung.

### 4.5 Ausblick

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit und der anderer Autoren besteht weiterhin Grund zur Annahme, dass es sich bei DTNBP1 um ein Suszeptibilitäts-Gen für Schizophrenie handelt. Eindeutige Beweise dafür wurden bisher zwar nicht geliefert und auch in dieser Arbeit konnten die positiven Assoziationsergebnisse von Vorläuferstudien nicht in vollem Umfang repliziert werden. Jedoch stützen die Ergebnisse die Annahme, dass Variationen im DTNBP1-Gen an der Pathogenese der Schizophrenie beteiligt sind. Dabei weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass es einen Zusammenhang zwischen positiver Familienanamnese in Bezug auf Schizophrenie und genetischen Variationen im DTNBP1-Gen gibt. Weitere Studien mit höheren Fallzahlen werden nötig sein, um die genetischen Risikomarker auf dem DTNBP1-Gen und ihr mögliches Zusammenspiel mit Markern auf anderen Genen genauer zu detektieren. Techniken wie die genomweiten Assoziationsstudien werden hier einen großen Beitrag leisten können. Zudem werden auch detaillierte, funktionelle Untersuchungen von Einzelbasen-Polymorphismen und Haplotypen in Zusammenhang mit der Expression ihres Genprodukts und dessen Funktion erforderlich sein. Weiterhin könnten genauere Genotyp-Phänotyp-Analysen möglicherweise auch symptombezogen Marker identifizieren und untersuchen. In Kombination mit weiteren zellbiologischen Forschungen könnte es schließlich möglich sein, Medikamente zu entwickeln, die die Krankheit individueller und effektiver therapieren können.

## Abkürzungen und Fachbegriffe

Abkürzung	Bedeutung
5-HT-2A	5-Hydroxytryptamin-/Serotonin-Rezeptor
Akt1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
CCDC60	<i>coiled-coil domain-containing protein 60</i>
CENTG2	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 1
CNV	<i>copy number variants</i>
COMT	Catecholamin-O-Methyltransferase
CT	Computertomographie
Da	Dalton
DAPC	<i>dystrophine-associated-proteine-complex</i>
DAO	D-Aminosäureoxidase
DISC	Disrupted In Schizophrenia
DMD	Duchenne Muskeldystrophie
DRD3	Dopamin 3-Rezeptor
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistic Manual for Mental Disorders, Version vier</i>
DTNBP1	<i>dystrobrevin binding protein1</i>
DTNA	$\alpha$ -Dystrobrevin
DTNB	$\beta$ -Dystrobrevin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G	Guanin
G72	D-Aminosäure-Oxidase-Aktivator
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GRIA	<i><math>\alpha</math>-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic-acid (AMPA)-Receptor subunit GluR4</i>
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HF	Hippocampusfraktion
HTR4	Serotonin- 2A- Rezeptorgen
htSNP	<i>haplotype tagSNP</i>
HWE	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
ICD-10	<i>International Classification of Diseases, Version 10</i>
kD	Kilodalton
LD	Kopplungsungleichgewicht, <i>linkage Disequilibrium</i>
LSD	Lysergsäurediethylamid
mbp	Megabasenpaare
MAF	minimale Allelfrequenz
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>
Met	Methionin
Mg	Magnesium
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MRS	Protonen-Magnetresonanztomographie
MRT/MRI	Magnetresonanztomographie

## Abkürzungsverzeichnis

MS	Massenspektrometer
MYO18B	myosin XVIIIIB
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
nNOS	Nitroxidsynthase
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NOTCH 4	neurogenic locus homolog notch protein 4
NRG1	Neuregulin 1
NRGN	Neurogranin
p	Pico
PCB	Phencyclidin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PET	Positronen- Emissions- Tomographie
PLC	Phospholipase C
PPP3CC	Protein Phosphatase 3-Gen, die für die Calcineurin-γ-katalytische Untereinheit
PRKCA	Gen, codiert für Protein Kinase C
PRODH	Prolin Dehydrogenase
PSD	<i>postsynaptic densities</i>
RELN	Reelin
rpm	<i>rounds per minute</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RGS4	Regulator of G-Protein signaling 4
SAP	Shrimp alkaline phosphatase
SD	Standardabweichung
Ser	Serin
SKID	strukturiertes klinisches Interview
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , Einzelbasenpolymorphismus
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
STR	<i>short tandem repeats</i>
T	Thymin
TE	Tris-EDTA Puffer
TOF	time of flight
TRAR4	<i>trace amine associated receptor 6</i>
WHO	World Health Organisation
ZDHHC8	Zinc finger, DHHC domain containing 8
ZNF804A	zinc finger protein 804A
ZNS	Zentralnervensystem

## Literaturverzeichnis

Abi-Dargham, A, R Gil, J Krystal, R M Baldwin, J P Seibyl, M Bowers, C H van Dyck, D S Charney, R B Innis, M Laruelle, 1998, Increased striatal dopamine transmission in schizophrenia: confirmation in a second cohort: *Am J Psychiatry* v. 155, p. 761-767.

Abi-Dargham, A, J Rodenhiser, D Printz, Y Zea-Ponce, R Gil, LS Kegeles, R Weiss, T B Cooper, J J Mann, R L van Heertum, J M Gorman, M Laruelle, 2000, *Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia*: *Proc Natl Acad Sci USA* v. 97, p. 8104-8109.

Agerbo, E. M Byrne, W W Eaton, P B Mortensen, 2004, *Marital and Labor Market Status in the Long Run in Schizophrenia* *Arch Gen Psychiatry*:v. 61. P. 28-33.

American Psychiatric Association, 1994, *Task Force on DSM-IV. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV*. 4th ed., American Psychiatric Press, Washington DC.

Anderson, J., S Head, C Rae., J W Morley, 2000, *Brain function in Duchenne muscular dystrophy*: *Brain* 2000; v.125, p.4-13

Arolt, V, P Ohrmann, M Rothermundt, 2006, *Schizophrenie und verwandte Störungen - Neurobiologie*, in *Neurobiologie psychischer Störungen*: p.345-386.

Baiano, M, A David, A Versace, R Churchill, M Balestrieri, P Brambilla, 2007, *Anterior cingulate volumes in schizophrenia: a systematic review and a metaanalysis of MRI studies*: *Schizophr.Res*, v. 93, p.1-12.

Bailer U, H N Aschauer, S Kasper; 2002, *Genetik der Schizophrenie*, *J Neurol Neurochir Psychiatr* v. 3, p. 25–31.

Bartholdi, D, 2008, *Medizinische Genetik: Copy number variants (CNV): Krankheitsverursachend, Risikofaktor oder bedeutungslose Normvariante?* Schweiz Med Forum v8, p.1007-1008.

Bebbington, P E, L Kuipers, 1994, *The clinical utility of expressed emotion in Schizophrenia*: Acta Psychiatrica Scandinavica v.89, p.46-53

Beckmann, J S, X Estivill, S E Antonarakis, 2007, *Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability*: Nat Rev Genet v.8, p.639-646.

Benson, M A, S E Newey, E Martin-Rendon, R Hawkes, D J Blake, 2001, *Dysbindin, a novel coiled-coil-containing protein that interacts with the dystrobrevins in muscle and brain*: J. Biol. Chem. v.276, p.24232-24241.

Betcheva, E T, T Mushiroda, A Takahashi, M Kubo, S K Karachanak, I T Zaharieva, R V Vazharova, I I Dimova, V K Milanova, T Tolev, G Kirov, M J Owen, M C O'Donovan, N Kamatani, Y Nakamura, D I Toncheva, 2009, *Case-control association study of 59 candidate genes reveals the DRD2 SNP rs6277 (C957T) as the only susceptibility factor for schizophrenia in the Bulgarian population*: J Hum Genet. v. 54, p.98-107.

Bora, E, A Fornito, J Radua, M Walterfang, M Seal, S J Wood, M Yücel, D Velakoulis, C Pantelis, 2011, *Neuroanatomical abnormalities in schizophrenia: a multi-modal voxelwise meta-analysis and meta-regression analysis*. Schizophr Res v.127, p. 46-57.

Blake, D J, R Hawkes, M A Benson, P W Beesley, 1999, *Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia*: J Cell Biol v.147, p.645-658.

Bleuler, E, 1911, *Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien*. Deuticke, Leipzig Wien.

Bickeböller, H, C Fischer, 2007, *Einführung in die genetische Epidemiologie*. Springer Verlag Berlin, p.159-227

Blum, B P, J J Mann, 2002, *The GABAergic system in schizophrenia*: Int.J.Neuropsychopharmacol., v. 5, p. 159-179.

Bragg, A D, S S Das, S C Froehner, 2010, *Dystrophin-associated protein scaffolding in brain requires  $\alpha$ -dystrobrevin*: Neuroreport, v. 21, p.695-699

Bray, N J, P R Buckland, N M Williams, H J Williams, N Norton, M J Owen, M C O'Donovan, 2003, *A haplotype implicated in schizophrenia susceptibility is associated with reduced COMT expression in human brain*: Am.J.Hum.Genet,v. 73, p. 152-161.

Bray, N J, P R Buckland, M J Owen, M C O'Donovan, 2003, *Cis-acting variation in the expression of a high proportion of genes in human brain*: Hum Genet v. 113, p:149-153.

Bray, N J, A Preece, N M Williams, V Moskvina, P R Buckland, M J Owen, O'Donovan MC, 2005, *Haplotypes at the dystrobrevin binding protein 1 (DTNBP1) gene locus mediate risk for schizophrenia through reduced DTNBP1 expression*: Hum Mol Genet v.14, p.1947-1954.

Brinkmann, B G, A Agarwal, M W Sereda, A N Garratt, T Müller, H Wende, R M Stassart, S Nawaz, C Humml, V Velanac, K Radyushkin, S Goebbels, T M Fischer, R J Franklin, C Lai, H Ehrenreich, C Birchmeier, M H Schwab, K A Nave, 2008, *Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system*. Neuron v. 4, p. 581-595.

Brown A S, 2011a, *The environment and susceptibility to schizophrenia*: Prog Neurobiol. V. 93, p. 23-58.

Brown A S, 2011, *Further Evidence of Infectious Insults in the Pathogenesis and Pathophysiology of Schizophrenia*: Am J Psychiatry v. 168, p.764-766.



Brown A S, E J Derkits, 2010, *Prenatal Infection and Schizophrenia: A Review of Epidemiologic and Translational Studies*: Am J Psychiatry v. 167, p. 261-280.

Burdick ,K E., T E Goldberg, B Funke, J A Bates, T Lencz, R Kucherlapati, A K Malhotra, 2007, *DTNBP-1 genotype influences cognitive decline in schizophrenia*: Schizophrenia Research v. 89, p.169-172.

Butzlaff, R.L., Hooley, J.M., 1998, *Expressed emotion and psychiatric relapse: a meta-analysis*: Arch. Gen. Psychiatry v.55, p.547–552.

Cahn, W, H E Hulshoff Pol, E B Lems, N E van Haren, H G Schnack, J A vander Linden, P F Schothorst, H van Engeland, R S Kahn, 2002, *Brain volume changes in first-episode schizophrenia: a 1-year follow-up study*: Arch.Gen.Psychiatry, v.59, p.1002-1010.

Cannon, T D, K Cadenhead, B Cornblatt, S W Woods, J Addington, E Walker, 2008, *Prediction of psychosis in youth at high clinical risk: a multisite longitudinal study in North America*. Arch Gen Psychiatry v. 65, p. 28–37.

Cannon M, P B Jones, R M Murray, 2002, *Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review*: Am. J. Psychiatry, v. 159, p. 1080–1092.

Cantor-Graae E, J P Selten, 2005, *Schizophrenia and migration: a meta-analysis and review*: Am J Psychiatry, v. 162, p. 12-24.

Cardno, A G, E J Marshall, B Coid, A M Macdonald, T R Ribchester et al., 1999, *Heritability estimates for psychotic disorders: the Maudsley twin psychosis series*: Archives of General Psychiatry v.56, p162-168.

Cardno, AG, I I Gottesman, 2000, *Twin studies of schizophrenia: from bow-and-arrow concordances to star wars Mx and functional genomics*: Am J Med Genet v.97, p12-17.

Carter, C S, W Perlstein, R Ganguli, J Brar, M Mintun, J D Cohen, 1998, *Functional hypofrontality and working memory dysfunction in schizophrenia*: Am J of Psychiatry v.155, p.1285–7.

Chen, XW, Y Q Feng, C J Hao, X L Guo, X He, Z Y Zhou, N Guo, H P Huang, W Xiong, H Zheng, P L Zuo, C X Zhang, W Li, Z Zhou, 2008, *DTNBP1, a schizophrenia susceptibility gene, affects kinetics of transmitter release*: Cell Biol. v.181, p.791-801.

Cloninger, CR, 2002, *The discovery or susceptibility genes for mental disorders*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, v.99, p.13365-13367.

Craddock, N, M J Owen, 2007, *Rethinking psychosis: the disadvantages of a dichotomous classification now outweigh the advantages*: World Psychiatry, v.6, p.84-91.

Daly, M J, J D Rioux, S F Schaffner, T J Hudson, E S Lander, 2001, *High-resolution haplotype structure in the human genome*: Nat Genet v.29, p.229-232.

Datta, SR, A McQuillin, V Puri, K Choudhury, S Thirumalai, J Lawrence, J Pimm, N Bass, G Lamb, H Moorey, J Morgan, B Pুনুকল্লু, G Kandasami, S Kirwin, A Sule, D Qusted, D Curtis, H M Gurling, 2007, *Failure to confirm allelic and haplotypic association between markers at the chromosome 6p22.3 dystrobrevin-binding protein 1 (DTNBP1) locus and schizophrenia*. Behav Brain Funct v.3, p.50.

Davies, G, J Welham, D Chant, E F Torrey, J McGrath, 2003, *A systematic review and meta-analysis of Northern Hemisphere season of birth studies in schizophrenia*: Schizophr Bull.,v. 29, p. 587-93.

Díaz-Mataix, L, M C Scorza, A Bortolozzi, M Toth, P Celada, F Artigas, 2005, *Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in prefrontal cortex in the modulation of dopaminergic activity: role in atypical antipsychotic action*: J Neurosci v.25(47), p.10831-10843.

De Luca, V, D Voineskos, T Shinkai, G Wong, J L Kennedy, 2005, *Untranslated region haplotype in dysbindin gene: analysis in schizophrenia*. J Neural Transm v.112, p.1263-1267.

Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde DGPPN. *Behandlungsleitlinie Schizophrenie*. S3 Praxisleitlinien Psychiatrie und Psychotherapie Band 1. 2005. Steinkopff-Verlag,Darmstadt.

Dickman, D K, G W Davis, 2009, *The schizophrenia susceptibility gene dysbindin controls synaptic homeostasis*. Science v.326, p.1127-30.

Dutt, A, C McDonald, E Dempster, D Prata, M Shaikh, I Williams, K Schulze, N Marshall, M Walshe, M Allin, D Collier, R Murray, E Bramon, 2009, *The effect of COMT, BDNF, 5-HTT, NRG1 and DTNBP1 genes on hippocampal and lateral ventricular volume in psychosis*: Psychol Med v.39, p.1783-97.

Ehring, B U R, H Sundqvist, 1996, *Existed state relaxation processes of maldimatrices by luminescence spectroscopy*. Appl. Surf. Sc. v.96-98, p. 577-580.

Ellison-Wright, I, E Bullmore, 2010, *Anatomy of bipolar disorder and schizophrenia: A meta-analysis*: Schizophrenia Res, v. 117, p. 1–12.

Falkai, P, W G Honer, S David, B Bogerts, C Majtenyi, T A Bayer., 1999, *No evidence for astrogliosis in brains of schizophrenic patients. A post-mortem study*: Neuropathol Appl Neurobiol v. 25, p. 48–53.

Falkai, P, T Schneider-Axmann, W G Honer., 2000, *Entorhinal cortex pre-alpha cell-clusters in schizophrenia: quantitative evidence of a developmental abnormality*: Biol Psychiatry v.47, p.937–943.

Falkai, P, T Schneider-Axmann, W G Honer, K Vogeley, H Schonell, U Pfeiffer, H Scherk, W Block, F Traber, H H Schild, W Maier, R Tepest, 2003, *Influence of genetic loading, obstetric complications and premorbid adjustment on brain morphology in schizophrenia: a MRI study*: Eur.Arch.Psychiatry Clin.Neurosci., v.253, p.92-99.

Falkai, P, W Maier, 2006, *Fortschritte in der neurobiologischen Erforschung der Schizophrenie*: Nervenarzt, v.77, p.S65-S74.

Falkai, P, WG Honer, T Kamer, S Dustert, K Vogeley, T Schneider-Axmann, I Dani, M Wagner, M Rietschel, D J Müller, T G Schulze, W Gaebel, J Cordes, H Schönnell, H Schild, W Block, F Träber, H Steinmetz, W Maier, R Tepest, 2007, *Disturbed frontal gyrification within families affected with schizophrenia*: J Psychiatr Res. v.41, p.805–13.

Falls, D L, 2003, *Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies*: Exp.Cell Res., v. 284, no. 1, p. 14-30.

Fan, H, J-Y Chu, 2007, *A brief review of STR-Mutation*, Geno. Prot. Bioinfo. v. 5, p. 7-14.

Fanous, A H., E J van den Oord EJ., B P Riley, S H Aggen, M C Neale, F A O'Neill, D Walsh, K S Kendler, 2005, *Relationship between a high-risk haplotype in the DTNBP-1 (Dysbindin) gene and clinical features of schizophrenia*: American Journal of Psychiatry, v.162, p.1824-1834.

Feng, YQ, Z Y Zhou, X He, H Wang, X L Guo, C J Hao, Y Gou, X C Zhen, W Li, 2008, *Dysbindin deficiency in sandy mice causes reduction of snapin and displays behaviors related to schizophrenia*: Schizophr. v106, p.218-28

Franzen, G., D.H. Ingvar, 1975, *Absence of activation in frontal structures during psychological testing of chronic schizophrenics*: Neurol. Neurosurg. Psychiatry v. 38, p. 1027–1032.

Frazer, K A, D G Ballinger, DR Cox, DA Hinds, LL Stuve R A Gibbs., 2007, *International HapMap Consortium, A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs*. Nature v.449, p.851-61.

Funke, B, C T Finn, A M Plocik, S Lake, P DeRosse, J M Kane, R Kucherlapati, A K Malhotra, 2004, *Association of the DTNBP1 locus with schizophrenia in a U.S. population*. Am J Hum Genet v. 75, p. 891-898.

Gabriel, S B, S F Schaffner, H Nguyen, J M Moore, J Roy, B Blumenstiel, J Higgins, M DeFelice, A Lochner, M Faggart, S N Liu-Cordero, C Rotimi, A Adeyemo, R Cooper, R Ward, E S Lander, M J Daly, D Altshuler, 2002, *The structure of haplotype blocks in the human genome*: Science, v.296, p.2225-2229.

Gallinat, J, Y Gudlowski, 2008, *Die Glutamathypothese der Schizophrenie*. Nervenheilkunde v.27, p.317-325.

gbe-bund.de, Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Mai 2010

Geddes, J R, H Verdoux, N Takei, S M Lawrie, P Bovet, J M Eagles, R Heun, R G McCreadie, T F McNeil, E O'Callaghan, G Stöber, U Willinger, R M Murray, 1999, *Schizophrenia and complications of pregnancy and labor: an individual patient data meta-analysis*: Schizophr Bull, v. 25, p. 413-23.

Goff, D C, J T Coyle, 2001, *The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia*: Am J Psychiatry v.158, p.1367– 137.

Gottesman, I I, D L Wolfgram. 1991, *Schizophrenia genesis: the origins of madness*. New York: Freeman.

Gottesmann, I I, L Erlenmeyer-Kimling, 2001. *Family and twin strategies as a head start in defining prodromes and endophenotypes for hypothetical early-interventions in schizophrenia*: Schizophrenia Research, v.51, p.93-102

Grieß,E, B Meckelein, K Schulz, P Seransi, E Setzke, 2002, *Isolierung von DNA*, in G Schimpf (ed), *Gentechnische Methoden*: Spektrum Akademischer Verlag.

Haff, L A, I P Smirnov, 1997, *Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDITOF mass spectrometry*: Genome Res., v. 7, p. 378-388.

Harrison, P J, 1999, *The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation*: Brain v.122, p.593-624.

Harrison, P J, D R Weinberger, 2005, *Neuropathology and genetics of schizophrenia. Molecular Psychiatry*: v.10, p.40–68

Haslam, J, 1809, *Observations on Madness and Melancholy*. J Callou, London.

Häfner, H, 1993, *What is schizophrenia?* Neurology, Psychopharmacology and Brain Research v.2, p.36-52.

Häfner, H, 1995a, Häfner H (Hrsg) *Was ist Schizophrenie?* Fischer, Stuttgart Jena New York, S 1-56.

Häfner, H, K Maurer, W Löffler, S Bustamente W an der Heiden, A Riecher-Rössler, 1995b, *Onset and early course of schizophrenia*, in: Häfner H, W F Gattaz (Hrsg.): *Search for the courses of schizophrenia*. Springer-Verlag, Berlin, v.3, p. 43-66].

Häfner, H, M Hambrecht, W Löffler, P Munk-Jorgenson, A Riecher-Rössler, 1998, *Is schizophrenia a disorder of all ages? A comparison of first episodes and early course over the life-cycle*. Psychological Medicine, v.; p. 357-365

Häfner, H, K Maurer, W An der Heiden, 2013, *Schizophrenia – a disorder in its own right? Results from 25 years of the ABC study*. Nervenarzt v. 9, p. 1093-1096

Harris, E.C., B Barraclough, 1998, *Excess mortality of mental disorder*. Br J Psychiatry, v.173, p.11–53.

Harrison, P J, 1999, *The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation*: Brain, v.122, p.593-624.

Hattori, E, C Liu, H Zhu, E S Gershon, 2005, *Genetic tests of biologic systems in affective disorders*: Molecular Psychiatry v.10, p719-740.

Hawton, K, L Sutton, C Haw, 2005. *Schizophrenia and suicide: systematic review of risk factors*: Br. J. Psychiatry 187, 9–20.

Hendren, RL, I de Backer, G J Pandina, 2000, *Review of neuroimaging studies of child and adolescent psychiatric disorders from the past 10 years*: J.Am.Acad.Child Adolesc.Psychiatry, v.39, p.815-828.

Hettema, J M, D Walsh, K S Kendler, 1996, *Testing the effect of season of birth on familial risk for schizophrenia and related disorders*: Br.J.Psychiatry, v.168, p.205-209.

Holliday, E G, H Y Handoko, M R James J J McGrath, D A Nertney, S Tirupati, R Thara, D F Levinson, N K Hayward, B J Mowry, D R Nyholt, 2006, *Association study of the dystrobrevin-binding gene with schizophrenia in Australian and Indian samples*: Twin Res Hum Genet, v.9, p.531–539.

Hor, K, M Taylor, 2010, *Suicide and schizophrenia: a systematic review of rates and risk factors*: J Psychopharmacol v.24, p. 81-90

Hulshoff Pol, H E, H G Schnack, M G Bertens, N E van Haren, I van der Tweel, W G Staal, W F Baaré, R S Kahn, 2002, *Volume changes in gray matter in patients with schizophrenia*: Am J Psychiatry, v.159, p. 244-50.

Ichikawa, J, H Ishii, S Bonaccorso, W L Fowler, I A O'Laughlin, H Y Meltzer, 2001, *5-HT(2A) and D(2) receptor blockade increases cortical DA release via 5-HT(1A) receptor activation: a possible mechanism of atypical antipsychotic-induced cortical dopamine release*: J Neurochem v.76, p.1521-1531.

International HapMap Consortium, 2005, *A haplotype map of the human genome*: Nature, v.437, p.1299-1320

Iritani, S, 2007, *Neuropathology of schizophrenia: a mini review*. Neuropathology, v. 27, p. 604-608.

Jablensky, A, S W Cole, 1997, *Is the earlier age at onset of schizophrenia in males a confounded finding? Results from a cross-cultural investigation*: Br J Psychiatry v.170, p.234-240.

Jablensky, A, 2003, *Schizophrenia: the epidemiological horizon*. in: Hirsch SR, Weinberger DR, eds. Schizophrenia. 2nd ed. Oxford, United Kingdom: Blackwell Science, p. 203–31.

Jackson, JH, 1931, *Selected Writings of J. Hughlings Jackson*. Taylor J (Hrsg.), Hodder and Stoughton Ltd, London.

Jakob, H., H. Beckmann (1986): *Prenatal developmental disturbances in the limbic allocortex in schizophrenics*: J. Neural Transm. 1986 65, 303; 1986

Jones, K., A Compton.,N Yang. M A Mills, M F Peters, D Mowat, L M Kunkel, S C Froehner, K N North, 2003, *Deficiency of the syntrophins and  $\alpha$ -dystrobrevin in patients with inherited myopathy*: Neuromuscular disorders, v13, p.456- 467

Johnson, G C, L Esposito, B J Barratt, A N Smith, J Heward, G Di Genova, H Ueda, H J Cordell, I A Eaves, F Dudbridge, R C Twells, F Payne, W Hughes, S Nutland, H Stevens, P Carr, E Tuomilehto-Wolf, J Tuomilehto, S C Gough, D G Clayton, J A Todd, 2001, *Haplotype tagging for the identification of common disease genes*: Nat Genet, v. 29, p. 233-237.

Johnstone, E C, T J Crow, C D Frith, J Husband, L Kreel, 1976, *Cerebral ventricular size and cognitive impairment in chronic schizophrenia*: Lancet, v.2, p.924-926.

Joo, E J, K Y Lee, S H Jeong, Y M Ahn, Y J Koo, Y S Kim, 2006, *The dysbindin gene (DTNBP1) and schizophrenia: no support for an association in the Korean population*: Neurosci Lett v.407, p.101–106.



Kapur, S, G Remington, 1996, *Serotonin-dopamine interaction and its relevance to schizophrenia*: Am J Psychiatry v.153, p.466-476.

Karas, M, F Hillenkamp, 1988, *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*: Anal Chem v.60, p2299-2301.

Kay, S.R., A Fiszbein, L A Opler, 1987, *The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia*. Schizophrenia Bulletin, v.13, p.261-276.

Keller, A, F X Castellanos, A C Vaituzis, N O Jeffries, J N Giedd, J L Rapoport, 2003, *Progressive loss of cerebellar volume in childhood-onset schizophrenia*: Am.J.Psychiatry, v.160, p.128-133.

Kendler, K S, S R Diehl, 1993, *The genetics of schizophrenia: a current, genetic-epidemiologic perspective*: Schizophr Bull v.19, p.261-285.

Kendler, K S, A M Gruenberg, D Kinney, 1994, *Independent diagnoses of adoptees and relatives as defined by DSM-III in the provincial and national samples of the Danish adoption study of schizophrenia*: Archives of General Psychiatry, v.151, p27-41

Kendler, K S, C O Gardner, 1997, *The risk for psychiatric disorders in relatives of schizophrenic and control probands: a comparison of three independent studies*: Psychological Medicine v.27, p411-419

Kennedy, M B, 1997, *The postsynaptic density at glutamatergic synapses*: Trends in Neuroscience, v.20, p. 264–268.

Kennedy, M B, 2000, *Signal-processing machines at the postsynaptic density*: Science v.290, p.750–4.

Keshavan, M S, R Tandon, N N Boutros, H A Nasrallah, 2008, *Schizophrenia, "just the facts": what we know in 2008 Part 3: neurobiology*: Schizophr.Res, v.106, p. 89-107.

Kircher, T., F Schneider, H Sauer, G Buchkremer, 2004, *Funktionelle Bildgebung am Beispiel der Schizophrenie*: Dtsch Arztebl v.101, p1975-1980

Kirov, G, D Ivanov, N M Williams, A Preece, I Nikolov, R Milev, S Koleva, A Dimitrova, D Toncheva, M C O'Donovan, M J Owen, 2004, *Strong evidence for association between the dystrobrevin binding protein 1 gene (DTNBP1) and schizophrenia in 488 parent-offspring trios from Bulgaria*: Biol Psychiatry, v.55, p.971-975.

Kirov, G, I Zaharieva, L Georgieva, V Moskvina, I Nikolov, S Cichon, A Hillmer, D Toncheva, M J Owen, M C O'Donovan, 2009, *A genome-wide association study in 574 schizophrenia trios using DNA pooling*: Mol.Psychiatry, v. 14, p. 796-803.

Konradi, C, S Heckers, 2003, *Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment*: Pharmacol.Ther., v. 97, p. 153-179.

Kraepelin, E, 1893, *Psychiatrie*. 4. Auflage, Abel (Meixner), Leipzig.

Kraepelin, E, 1896, *Dementia praecox. Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte*, 5. Auflage ed. Barth, Leipzig.

Krystal, J H, L P Karper, J P Seibyl, G K Freeman, R Delaney, J D Bremner, G R Heninger, M B Bowers jr, D S Charney, 1994, *Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses*: Arch Gen Psychiatry v.51, p.199-214.

Laruelle, M, A Abi-Dargham, M F Casanova, R Toti, D R Weinberger, J E Kleinmann, 1992, *Selective abnormalities of prefrontal serotonergic receptors in schizophrenia*, Journal of Neural Transmission, v.36, p.91-131.

Laruelle, M, A Abi-Dargham, C H van Dyck, R Gil, C D D'Souza, J Erdos, E McCance, W Rosenblatt, C Fingado, S S Zoghbi, R M Baldwin, J P Seibyl, J H Krystal, D S Charney, R B Innis, 1996, *Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects*: Proc Natl Acad Sci U S A 93 v.17, p 9235-9240

Laursen, T M; T Munk-Olsen, M Vestergaard, 2012, *Life expectancy and cardiovascular mortality in persons with schizophrenia*: Current Opinion in Psychiatry, v. 25, p. 83-88.

Lawrie S M, S S Abukmeil, 1998, *Brain abnormality in schizophrenia: a systematic and quantitative review of volumetric magnet resonance imaging studies*: British Journal of Psychiatry, v.172. p.110-120.

Lawyer F C, S Stoffel, R K Saiki, S-Y Chang, P A Landre, R D Abramson, D H Gelfand, 1993, *High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length Thermus aquaticus DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity*.: PCR Methods Appl.. 2, v. 4, p. 275–287

Lewis, M S, 1989, *Age incidence and schizophrenia: Part I. The season of birth controversy*: Schizophr.Bull., v.15, p.59-73.

Li, T, F Zhang, X Liu, X Sun, P C Sham, C Crombie et al., 2005, *Identifying potential risk haplotypes for schizophrenia at the DTNBP1 locus in Han Chinese and Scottish populations*. Mol. Psychiatry v.10, p.1037–1044.

Li, W, Q Zhang, N Oiso, E K Novak, R Gautam, E P O'Brien, C L Tinsley. D J Blake, R A Spritz, N G Copeland, N A Jenkins, D Amato, B A Roe, M Starcevic, E C Dell'Angelica, R W Elliott, V Mishra, S F Kingsmore, R E Paylor, R T Swank, 2003, *Hermansky-Pudlak syndrome type 7 (HPS-7) results from mutant dysbindin, a member of the biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 (BLOC-1)*: Nat. Genet., v.35, p.84-89

Lovering, RM., N C Porter, R J Bloch, 2005, *The muscular dystrophies: from genetics to therapies*: Physical Therapy, v.395, p587-598

Louneva, N., K Talbot., M Cox., L Y Han, D J Blake, S E Arnold, 2007, *Dysbindin-1 isoforms are differentially localized in pre- and post-synaptic fractions of the mouse brain*: Society for Neuroscience Annual Meeting, Abstract 59.7, San Diego, CA.

- Luciano, M, F Miyajima, P A Lind, T C Bates, M Horan, S E Harris, M J Wright, W E Ollier, C Hayward, N Pendleton, A J Gow, P M Visscher, J M Starr, I J Deary, N G Martin, A Payton, 2009, *Variation in the Dysbindin gene and normal cognitive function in three independent population samples*: Genes Brain Behav v.8, p.218–227.
- Maier, W, D Lichtermann, M Rietschel, T Held, P Falkai, M Wagner, S Schwab, 1999, *Genetics of schizophrenic disorders. New concepts and findings.*: Nervenarzt, v. 70, p.955-969.
- Mattick, J S, I V Makunin, 2006, *Non-coding RNA*: Human Molecular Genetics, v.15, p.17-29
- McCarley, R W, C G Wible, M Frumin, Y Hirayasu, J J Levitt, I A Fischer, M E Shenton, 1999, *MRI anatomy of schizophrenia*: Biol Psychiatry, v.45, p.1099–119.
- McClellan, J M, E Susser, M C King, 2007, *Schizophrenia: a common disease caused by multiple rare alleles*: Br.J.Psychiatry, v.190, p.194-199.
- McGrath J, J Scott J, 2006, *Urban birth and risk of schizophrenia: a worrying example of epidemiology where the data are stronger than the hypotheses*: Epidemiol Psychiatr Soc. v. 15, p.243-6.
- McGrath, J, S Saha, J Welham, O El Saadi, C MacCauley, D Chant, 2004, *A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology*: BMC. Med., v.2, p.13.
- McGrath, J J, 2005, *Myths and plain truth about schizophrenia epidemiology – the NAPE lecture 2004*: Acta Psychiatr Scand, v.111, p.4-11.
- McGue, M, I Gottesman, 1989, *Genetic linkage in schizophrenia. Perspectives from genetic epidemiology*: Schizophrenia Bulletin v.15, p.453-464.
- Meador-Woodruff, J H, D J Healy, 2000, *Glutamate receptor expression in schizophrenia brain*: Brain Res Interactive, v.31, p.288-294.

Messias E, CY Chen, W W Eaton, 2007, *Epidemiology of Schizophrenia: Review of Findings and Myths*: Psychiatr Clin North v.30, p. 323–338.

Meyer, J M, H A Nasrallah (Eds.), 2009. *Medical Illness and Schizophrenia*. American Psychiatric Press, Washington D.C.

Möller, H J, G Laux, A Deister, 2013, *Psychiatrie und Psychotherapie*. 5. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Mössner, R, W Maier, D Rujescu, 2009, *Neue Erkenntnisse zur Genetik der Schizophrenie*. Der Nervenarzt v. 80, p. 6-11

Moore, T H, S Zammit S, A Lingford-Hughes, T R Barnes, P B Jones, M Burke, G Lewis, 2007, *Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review*: Lancet, v.370, p. 319-28.

Morris, D W, K A McGhee, S Schwaiger, P Scully, J Quinn, D Meagher, J L Waddington, M Gill, A P Corvin, 2003, *No evidence for association of the dysbindin gene [DTNBP1] with schizophrenia in an Irish population-based study*. Schizophr Res, v. 60, p.167-172.

Mullin, A, A Gokhale, J Larimore, V Faundez, 2011, *Cell Biology of the BLOC-1 Complex Subunit Dysbindin, a Schizophrenia Susceptibility Gene*: Mol Neurobiol, v. 44, p. 53-64

Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E, 2006, *Taschenlehrbuch Humangenetik*. 7.Auflage, Georg Thieme Verlag

NCBI, 2014, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Need A C, D Ge D, M E Weale, J Maia, S Feng, E L Heinzen, K V Shianna, W Yoon, D Kasperaviciute, M Gennarelli, W J Strittmatter, C Bonvicini, G Rossi, K Jayathilake, P A. Cola, J P McEvoy, R S E Keefe, E M C Fisher, P L St. Jean, I Giegling, A MHartmann, H-J Möller, A Ruppert, G Fraser, C Crombie, L T Middleton, D St. Clair, A D. Roses, P Muglia, C Francks, D Rujescu, H Y Meltzer, D B Goldstein, 2009, A

*Genome-Wide Investigation of SNPs and CNVs in Schizophrenia*. PLoS Genet, v.5, p.(2): e1000373. doi:10.1371/journal.pgen.1000373

Newton, M E, 2005, *Linkage disequilibrium maps and association mapping*: J. Clin. Invest., v.115, p.1425–1430

Ng,MY, D F Levinson, S V Faraone, B K Suarez, L E DeLisi, T Arinami, B Riley, T Paunio, A E Pulver, Irmansyah, P A Holmans, M Escamilla, D B Wildenauer, N M Williams, C Laurent, B J Mowry, L M Brzustowicz, M Maziade, P Sklar, D L Garver, G R Abecasis, B Lerer, M D Fallin, H M Gurling, P V Gejman, E Lindholm, H W Moises, W Byerley, E M Wijsman, P Forabosco, M T Tsuang, H G Hwu, Y Okazaki, K S Kendler, B Wormley, A Fanous, D Walsh, F A O'Neill, L Peltonen, G Nestadt, V K Lasseter, K Y Liang, G M Papadimitriou, D G Dikeos, S G Schwab, M J Owen, M C O'Donovan, N Norton, E Hare, H Raventos, H Nicolini, M Albus, W Maier, V L Nimgaonkar, L Terenius, J Mallet, M Jay, S Godard, D Nertney, M Alexander, R R Crowe, J M Silverman, A S Bassett, M A Roy, C Merette, C N Pato, M T Pato, J L Roos, Y Kohn, D Amann-Zalcenstein, G Kalsi, A McQuillin, D Curtis, J Brynjolfson, T Sigmundsson, H Petursson, A R Sanders, J Duan, E Jazin, M Myles-Worsley, M Karayiorgou, C M Lewis, 2009, *Meta-analysis of 32 genome-wide linkage studies of schizophrenia*: Mol.Psychiatry, v.14, p.774-785.

Numakawa, T, Y Yagasaki, T Ishimoto, T Okada, T Suzuki, N Iwata, N Ozaki, T Taguchi, M Tatsumi, K Kamijima, R E Straub, D R Weinberger, H Kunugi, R Hashimoto, 2004, *Evidence of novel neuronal functions of dysbindin, a susceptibility gene for schizophrenia*. Hum Mol Genet v.13, p.2699-2708.

O'Donovan, M C, N Craddock, N Norton, H Williams, T Peirce, V Moskvina, I Nikolov, M Hamshere, L Carroll, L Georgieva, S Dwyer, P Holmans, J L Marchini, C C Spencer, B Howie, H T Leung, A M Hartmann, H J Moller, D W Morris Y, Shi G, Feng, P Hoffmann, P Propping, C Vasilescu, W Maier, M Rietschel, S Zammit, J Schumacher, E M Quinn, T G Schulze, N M Williams, I Giegling, N Iwata, M Ikeda, A Darvasi, S Shifman, L He, J Duan, A R Sanders, D F Levinson, P V Gejman, S Cichon, M M Nothen, M Gill, A Corvin, D Rujescu, G Kirov, M J Owen, N G Buccola, B J Mowry, R Freedman, F Amin, D W Black, J M Silverman, W F Byerley, C R Cloninger, 2008,

*Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up: Nat.Genet.*, v. 40, p1053-1055.

Oeth, P, M Beaulieu, C Park, D Kosman, G del Mistro, D van den Boom, C Jurinke, 2005, *iPLEX Assay: Increased Plexing Efficiency and Flexibility for MassARRAY System Through Singl Base Primer Extension with Mass-Modified Terminators: Sequenom Application Note*.

Olbrich, H M, G Valerius, N Rusch, M Buchert, T Thiel, J Hennig, D Ebert, L T van Elst, 2008, *Frontolimbic glutamate alterations in first episode schizophrenia: evidence from a magnetic resonance spectroscopy study: World J Biol.Psychiatry*, v.9, p.59-63.

Olney, J W, N B Farber, 1995, *Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia: Arch Gen Psychiatry*, v.52, p.998-1007.

Owen, M J, 2000, *Molecular genetic studies of schizophrenia: Brain Research*, v.31, p.179-186.

Owen, M J, N M Williams, M C O'Donovan, 2004, *The molecular genetics of schizophrenia: new findings promise new insights. Molecular Psychiatry*, v.9, p.14–27

Owen, M J., M C O'Donovan, 2004b, *Dysbindin-1 and schizophrenia: from genetics to neuropathology:Journal of Clinical Investigation*, v.113, p.1255-1257

Palaniyappan, L, P F Liddle, 2012, *Aberrant cortical gyrification in schizophrenia: a surface-based morphometry study: J Psychiatry Neurosci.*, v.37, p.399–406.

Palmer, B.A., V S Pankratz, J M Bostwick, 2005, *The lifetime risk of suicide in schizophrenia: a re-examination:Arch. Gen. Psychiatry*, v.62, p.247–253.

Perälä J, Suvisaari J, Samuli I, et al., 2007, *Lifetime prevalence of psychotic and bipolar I disorders in a general population: Arch Gen Psychiatry*, v. 64, p. 19–28.

Peters K, S Wiltshire, A K Henders, M Dragovic, J C Badcock, D Chandler, S Howell, C Ellis, S Bouwer, G W Montgomery, L J Palmer, L Kalaydjieva, A Jablensky, 2008, *Comprehensive analysis of tagging sequence variants in DTNBP1 shows no association with schizophrenia or with its composite neurocognitive endophenotypes*: Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, v.10, p.1002

Pilgram, G S, S Potikanond, R A Baines, L G Fradkin, J N Noordermeer, 2010, *The Roles of the Dystrophin-Associated Glycoprotein Complex at the Synapse*: Mol Neurobiol, v. 41, p. 1-21

Pinel, PH, 1801, *Traite Médico-Philosophique sur l'Alienation Mentale, ou la Manie*. Anton Brosson, Paris.

Pompili, M, D Lester, M Innamorati, R Tatarelli, P Giradelli, 2008. *Assessment and treatment of suicide risk in schizophrenia*: Expert Rev. Neurotherapeutics v.8, p.51–74.

Purcell, S M, N R Wray, J L Stone, P M Visscher, M C O'Donovan, P F Sullivan, P Sklar, 2009, *Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder*: Nature, v. 460, p.748-752.

Qiagen, 2002, *Handbuch für QIAamp® DNA Mini Kits und QIAamp DNA Blood Mini Kits*.

Rajarethinam, R P, J R DeQuardo, R Nalepa, R Tandon, 2000, *Superior temporal gyrus in schizophrenia: a volumetric magnetic resonance imaging study*: Schizophr.Res, v. 41, p. 303-312.

Rasser, P E, U Schall, G Peck, M Cohen, P Johnston, K Khoo, V J. Carr, P B Ward, P M Thompson, 2010, *Cerebellar grey matter deficits in first-episode schizophrenia mapped using cortical pattern matching*: NeuroImage v. 53, p. 1175-1180

Rengarajan, K, S M Cristol, M Mehta, J M Nickerson, 2002, *Quantifying DNA concentrations using fluorometry: a comparison of fluorophores*: Mol.Vis., v. 8, p. 416-421.



Rice, JP, T Reich, K K Bucholz, R J Neuman, R Fishman, N Rochberg, V M Hesselbrock, J I Nurnberger Jr, M A Schuckit, H Begleiter, 1995, *Comparison of direct interview and family history diagnoses of alcohol dependence*. Alcoholism, Clinical and Experimental Research, v.19, p.1018-1023.

Riedel, M, H-J Möller 2007, *Schizophrene und schizophreniforme Störungen*. In: *Medizinische Therapie*, Springer Berlin Heidelberg, p. 1507-1518.

Riley, B, P-H Kuo, B S Maher, A H Fanous, J Sun, B Wormley, F A O'Neill, D Walsh, Z Zhao, K S Kendler, 2009, *The dystrobrevin binding protein 1 (DTNBP1) gene is associated with schizophrenia in the Irish Case Control Study of Schizophrenia (IC-CSS) sample* :Schizophr Res., v.115, p.245–253.

Rosenthal, D, S Kety, 1968, *Schizophrenic offspring raised in adoptive homes*: Journal of Psychiatry Research, v.6, p.377-391

Ross, C A, R L Margolis, S A Reading, M Pletnikov, J T Coyle, 2006, *Neurobiology of Schizophrenia*: Neuron, v.52, p.139-153.

Roy, A, M Pompili, 2009, *Management of schizophrenia with suicide risk*: Psychiatr Clin North Am., v.32, p. 863–883.

Ruhrmann, S, F Schultze-Lutter, R K Salokangas, M Heinimaa, D Linszen, P Dingemans, 2010, *Prediction of psychosis in adolescents and young adults at high risk: results from the prospective European prediction of psychosis study*. Arch Gen Psychiatry v. 67, p. 241–251.

Saha, S, D Chant, J Welham, J McGrath, 2005, *A systematic review of the prevalence of schizophrenia*. PLoS.Med., v.2, p.e141.

Saha, S, J Welham, D Chant, J McGrath, 2006, *Incidence of schizophrenia does not vary with economic status of the country: evidence from a systematic review*: Soc.Psychiatry Psychiatr.Epidemiol., v.41, p.338-340.

Saha, S., D Chant, J McGrath, 2007, *A systematic review of mortality in schizophrenia: is the differential mortality gap worsening over time*: Arch Gen Psychiatry, v.64, p.1123–1131.

Sanders, A R, J Duan, D F Levinson, J Shi, D He, C Hou, G J Burrell, J P Rice, D A Nertney, A Olincy, P Rozic, S Vinogradov, N G Buccola, B J Mowry, R Freedman, F Amin, D W Black, J M Silverman, W F Byerley, R R Crowe, C R Cloninger, M Martinez, P V Gejman, 2008, *No significant association of 14 candidate genes with schizophrenia in a large European ancestry sample: implications for psychiatric genetics*. Am J Psychiatry, v.165, p.497–506.

Sawa, A, S H Snyder, 2002, *Schizophrenia: diverse approaches to a complex disease*: Science, v.296, p.692-695.

Scharfman, H E, M P Witter, R Schwarcz, 2000, *The parahippocampal region. Implications for neurological and psychiatric diseases. Introduction*: Ann N Y Acad Sci, v. 911, p.ix-xiii.

Schenkel, L.S., S M Silverstein, 2004, *Dimensions of premorbid functioning in schizophrenia: a review of neuromotor, cognitive, social, and behavioral domains*: Genetic, Social, and General Psychol. Monogr., v.130, p.241–270.

Scherk, H, K Vogeely, P Falkai, 2003, *Die Bedeutung von Interneuronen bei affektiven und schizophrenen Erkrankungen*: Fortschritt Neurologie Psychiatrie, v.71, p27-32.

Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014, *Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci*. Nature v. 511, p. 421-427.

Ripke, S et al.;2011, *Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci*. Nature Genetics, 43: 969–976

Schneider, K, 1992, *Klinische Psychopathologie*, 14. Aufl., Thieme, Stuttgart-New York.

Schulze, T G, F J McMahon, 2002, *Genetic Association Mapping at the Crossroads: Which Test and Why? Overview and Practical Guidelines.*: American Journal of Medical Genetics Neuropsychiatric Genetics, v.114, p1-11.

Schwab, S G, M Knapp, S Mondabon, J Hallmayer, M Borrmann-Hassenbach, M Albus, B Lerer, M Rietschel, M Trixler, W Maier, D B Wildenauer, 2003, *Support for association of schizophrenia with genetic variation in the 6p22.3 gene, dysbindin, in sib-pair families with linkage and in an additional sample of triad families.* Am J Hum Genet, v.72, p.185-190.

Scott CTJ, C Kosmidis, W J Jia, L K.W.D., R P Singhal, 1995, *Investigation of desorbed species from matrix used in maldi.* AIP-Conference-Proceedings v.329, p64-67.

Seeman, M.V., 2007. *An outcome measure in schizophrenia: mortality.* Can J Psychiatry, v.52, p.55–60.

Sequenom, 2005, MassARRAY® Assay Design 3.1 Software User's Guide, San Diego.

Seyffer, W, 2003, *Lehrbuch der Genetik*, 2.Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Shao, L, Y Shuai, J Wang, S Feng, B Lu, Z Li, Y Zhao, L Wang, Y Zhong, 2011, *Schizophrenia susceptibility gene dysbindin regulates glutamatergic and dopaminergic functions via distinctive mechanisms in Drosophila.* Proc. Natl. Acad. Sci., v108, p.18831-6.

Sheng, M, E Kim, 1996, *Ion channel associated proteins.* Curr Opin Neurobiol., v. 6, p.602-8.

Shenton, M E, C C Dickey, M Frumin, R W McCarley, 2001, *A review of MRI findings in schizophrenia*: Schizophr.Res, v. 49, p. 1-52.

Shepherd, M, D Watt, IRH Falloon, N Smeeton, 1989, *The Natural History of Schizophrenia: A Five-Year Follow-up Study of Outcome and Prediction in a Representative Sample of Schizophrenics* Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Shi, J, D F Levinson, J Duan, A R Sanders, Y Zheng, I Pe'er, F Dudbridge, P A Holmans, A S Whittemore, B J Mowry, A Olincy, F Amin, C R Cloninger, J M Silverman, N G Buccola, W F Byerley, D W Black, R R Crowe, J R Oksenberg, D B Mirel, K S Kendler, R Freedman, P V Gejman, 2009, *Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia*: Nature, v.460, p.753-757.

Shifman, S, M Johannesson, M Bronstein, S X Chen, D A Collier, N J Craddock, K S Kendler, T Li, M O'Donovan, F A O'Neill, M J Owen, D Walsh, D R Weinberger, C Sun, J Flint, A Darvasi, 2008, *Genome-wide association identifies a common variant in the reelin gene that increases the risk of schizophrenia only in women*: PLoS.Genet., v. 4, p. e28.

Snyder, S H, 1972, *Catecholamines in the brain as mediators of amphetamine psychosis*: Arch Gen Psychiatry. 1972 Aug;27(2):169–79.

Snyder, S H, 1973, *Amphetamine psychosis: a "model" schizophrenia mediated by catecholamines*: Am J Psychiatry, v.130, p.61–7.

Snyder, S H, 1976, *The dopamine hypothesis of schizophrenia: focus on the dopamine receptor*. Am J Psychiatry, v.133, p:197–202.

Stefansson, H, E Sigurdsson, V Steinthorsdottir, S Bjornsdottir, T Sigmundsson, S Ghosh, J Brynjolfsson, S Gunnarsdottir, O Ivarsson, T T Chou, O Hjaltason, B Birgisdottir, H Jonsson, V G Gudnadottir, E Gudmundsdottir, A Bjornsson, B Ingvarsson, A Ingason, S Sigfusson, H Hardardottir, R P Harvey, D Lai, M Zhou, D Brunner, V Mutel, A Gonzalo, G Lemke, J Sainz, G Johannesson, T Andreasson, D Gudbjartsson, A Manolescu, M L Frigge, M E Gurney, A Kong, J R Gulcher, H Petursson, K Stef-

ansson, 2002, *Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia*: Am.J.Hum.Genet, v.71, p.877-892.

Stefansson, H, D Rujescu, S Cichon, O P Pietilainen, A Ingason, S Steinberg, R Fossdal, E Sigurdsson, T Sigmundsson, J E Buizer-Voskamp, T Hansen, K D Jakobsen, P Muglia, C Francks, P M Matthews, A Gylfason, B V Halldorsson, D Gudbjartsson, T E Thorgeirsson, A Sigurdsson, A Jonasdottir, A Bjornsson, S Mattiasdottir, T Blondal, M Haraldsson, B B Magnusdottir, I Giegling, H J Möller, A Hartmann, K V Shianna, D Ge, A C Need, C Crombie, G Fraser, N Walker, J Lonnqvist, J Suvisaari, A Tuulio-Henriksson, T Paunio, T Touloupoulou, E Bramon, M Di Forti, R Murray, M Ruggeri, E Vassos, S Tosato, M Walshe, T Li, C Vasilescu, T W Muhleisen, A G Wang, H Ullum, S Djurovic, I Melle, J Olesen, L A Kiemeney, B Franke, R S Kahn, D Linszen, J van Os, D Wiersma, R Bruggeman, W Cahn, I Germeys, L de Haan, L Krabbendam, C Sabatti, N B Freimer, J R Gulcher, U Thorsteinsdottir, A Kong, O A Andreassen, R A Ophoff, A Georgi, M Rietschel, T Werge, H Petursson, D B Goldstein, M M Nothen, L Peltonen, D A Collier, D St Clair, K Stefansson, 2008, *Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia*. Nature, v.455, p.232-236.

Stefansson, H, R A Ophoff, S Steinberg, O A Andreassen, S Cichon, D Rujescu, T Werge, O P Pietilainen, O Mors, P B Mortensen, E Sigurdsson, O Gustafsson, M Nyegaard, A Tuulio-Henriksson, A Ingason, T Hansen, J Suvisaari, J Lonnqvist, T Paunio, A D Borglum, A Hartmann, A Fink-Jensen, M Nordentoft, D Hougaard, B Norgaard-Pedersen, Y Bottcher, J Olesen, R Breuer, H J Moller, I Giegling, H B Rasmussen, S Timm, M Mattheisen, I Bitter, J M Rethelyi, B B Magnusdottir, T Sigmundsson, P Olason, G Masson, J R Gulcher, M Haraldsson, R Fossdal, T E Thorgeirsson, U Thorsteinsdottir, M Ruggeri, S Tosato, B Franke, E Strengman, L A Kiemeney, I Melle, S Djurovic, L Abramova, V Kaleda, J Sanjuan, R de Frutos, E Bramon, E Vassos, G Fraser, U Ettinger, M Picchioni, N Walker, T Touloupoulou, A C Need, D Ge, J L Yoon, K V Shianna, N B Freimer, R M Cantor, R Murray, A Kong, V Golimbet, A Carracedo, C Arango, J Costas, E G Jonsson, L Terenius, I Agartz, H Petursson, M M Nothen, M Rietschel, P M Matthews, P Muglia, L Peltonen, D St Clair, D B Goldstein, K Stefansson, D A Collier, 2009, *Common variants conferring risk of schizophrenia*: Nature, v.460, p.744-747.

Stilo, S A, R M Murray, 2010, *The epidemiology of schizophrenia: replacing dogma with knowledge*: Dialogues Clin Neurosci., v. 12, p. 305–315.

Stone, J M, P D Morrison, L S Pilowsky, 2007, *Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia--a synthesis and selective review*: J Psychopharmacol, v.21, p.440-452.

Strachan, T, A P Read, 2005, *Molekulare Humangenetik*. 3. Aufl., Elsevier, München

Straub, R E, Y Jiang, C J MacLean, Y Ma, B T Webb, M V Myakishev, C Harris-Kerr, B Wormley, H Sadek, B Kadambi, A J Cesare, A Gibberman, X Wang, F A O'Neil, D Walsh, K S Kendler KS, 2002a *Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia*. Am J Hum Genet, v.71, p.337-348.

Straub, R E, C J MacLean, Y Ma, B T Webb, M V Myakishev, C Harris-Kerr, B Wormley, H Sadek, B Kadambi, F A O'Neill, D Walsh, K S Kendler, 2002b, *Genome-wide scans of three independent sets of 90 Irish multiPLEX schizophrenia families and follow-up of selected regions in all families provides evidence for multiple susceptibility genes*. Mol Psychiatry, v.7, p.542-559.

Straub, R E, 2003, *The schizophrenia susceptibility gene dysbindin (DTNBP1, 6p22.3): analysis of haplotypes, intermediate phenotypes and alternative transcripts*: Biological Psychiatry, v.53 (suppl.), p.167S-168S

Strohmaier, J, J Frank, J R Wendland, J Schumacher, R A Jamra, J Treutlein, V Nieratschker, R Breuer, M Mattheisen, S Herms, T W Mühleisen, W Maier, M M Nöthen, S Cichon, M Rietschel, T G Schulze, 2010, *A reappraisal of the association between Dysbindin (DTNBP1) and schizophrenia in a large combined case-control and familybased sample of German ancestry*: Schizophr Res., v.118, p.98–105.

Sullivan P F, P Giusti-Rodriguez, 2013, *The genomics of schizophrenia: update and implications*. J Clin Invest. v.123, p.4557–4563.

Tabor, H K, N J Risch, R M Myers, 2002, *Opinion: Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations*: Nat.Rev.Genet., v.3, p.391-397.

Talbot, K, W Y Ong, D J Blake., J Tang., N Louneva., G C Carlson, S E Arnold, 2009, *Dysbindin-1 and its protein family with special attention to the potential role of dysbindin-1 in neuronal functions and the pathophysiology of schizophrenia*: in: D Javitt, J Kantorowitz (eds.) *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. 3rd edn. v.27. Springer Scientific; New York.

Talbot, K, W L Eidem, C L Tinsley, M A Benson, E W Thompson, RJ Smith, C G Hahn, S J Siegel, J Q Trojanowski, R E Gur, D J Blake, S E Arnold, 2004, *Dysbindin-1 is reduced in intrinsic, glutamatergic terminals of the hippocampal formation in schizophrenia*: J Clin Invest, v.113, p.1353-1363.

Talbot, K, N Louneva, JW Cohen, H Kazi, DJ Blake, SE Arnold, 2011, *Synaptic Dysbindin-1 Reductions in Schizophrenia Occur in an Isoform-Specific Manner Indicating Their Subsynaptic Location*: PLoS ONE v. 6(3), e16886.

Tandon, R, Keshavan M S, Nasrallah H A. (2008) *Schizophrenia, "just the facts" what we know in 2008*. 2. Epidemiology and etiology: Schizophr.Res. 2008 v. 102, p. 1-18.

Tandon, R, M S Keshavan, H A Nasrallah, 2008, *Schizophrenia, "just the facts" what we know in 2008b*. 4. *Clinical features and conceptualisation*: Schizophr.Res, v.110, p.1-23.

Tang, J X, J Zhou, J B Fan, X W Li, Y Y Shi, N F Gu, G Y Feng, Y L Xing, J G Shi, L He, 2003, *Familybased association study of DTNBP1 in 6p22.3 and schizophrenia*. Mol Psychiatry, v.8, p.717-718.

Tang, J., R P Le Gros, N Louneva, L Yeh, J W Cohen, C-G Hahn, D J Blake, S E Arnold, K Talbot, 2009, *Dysbindin-1 in dorsolateral prefrontal cortex of schizophrenia cases is reduced in an isoform-specific manner unrelated to dysbindin-1 mRNA expression*. Hum. Molec. Genet., v.18, p.3851-3863.

Terry, A V Jr, J J Buccafusco, C Wilson, 2008, *Cognitive dysfunction in neuropsychiatric disorders: Selected serotonin receptor subtypes as therapeutic targets*: Behav Brain Res v.195, p.30-38.

Théberge, J, Y Al-Semaan, P C Williamson, R S Menon, R W Neufeld, N Rajakumar, B Schaefer, M Densmore, D J Drost, 2003, *Glutamate and glutamine measured with 4.0 T proton MRS in never-treated patients with schizophrenia and healthy volunteers*: American Journal of Psychiatry, v.159, p.1944-1946.

Thompson, P M, C Vidal, J N Giedd, P Gochman, J Blumenthal, R Nicolson, A W Toga, J L Rapoport, 2001, *Mapping adolescent brain change reveals dynamic wave of accelerated gray matter loss in very early-onset schizophrenia*: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, v.98, p.11650-11655.

Torrey, E F, A E Bowler, 1990, *The seasonality of schizophrenic births: a reply to Marc S. Lewis*: Schizophr.Bull., v.16, p.1-3.

Tosato, S, Ruggeri M, Bonetto C, Bertani M, Marrella G, Lasalvia A, Cristofalo D, April G, Tansella M, Dazzan P, Diforti M, Murray R M, Collier D A, 2007, *Association study of dysbindin gene with clinical and outcome measures in a representative cohort of Italian schizophrenic patients*: Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2007 v.144, p.647-59.

Tsai, G C, Coyle J T, 2002, *Glutamatergic mechanisms in schizophrenia*: Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.42, p.165-179.

Tsai, G E, P Yang, L C Chung, I C Tsai, C W Tsai, J T Coyle, 1999, *D-serine added to clozapine for the treatment of schizophrenia*: Am.J.Psychiatry, v. 156, p. 1822-1825.



Tsuang, M T, M Tohen, 2002, *Textbook in Psychiatric Epidemiology*, 2<sup>nd</sup> Edition, John Wiley & Sons, New York.

Tsuang, M T, M Tohen, G E P Zahner, 1995, *Textbook in Psychiatry epidemiology*. Wiley-Liss, New York.

Tsuang, M T, Stone W S und Faraone S V, 2001, *Genes, environment and schizophrenia*: British Journal of Psychiatry. Supplement, v.40, 18-24.

Turunen, J A, Peltonen J O, Pietilainen O P, Hennah W, Loukola A, Paunio T, Silander K, Ekelund J, Varilo T, Partonen T, Lonnqvist J, Peltonen L, 2007, *The role of DTNBP1, NRG1, and AKT1 in the genetics of schizophrenia in Finland*. Schizophr Res, v.91, p.27–36.

UCSC, 2009, <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?org=human>

Van Dongen, J, D I Boomsma, 2013, The evolutionary paradox and the missing heritability of schizophrenia, Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. v. 162B, p.122-36.

Van Den Bogaert, A, J Schumacher, T G Schulze, A C Otte, S Ohlraun, S Kovalenko, T Becker, J Freudenberg, E G Jonsson, M Mattila-Evenden, G C Sedvall, P M Czerski, P Kapelski, J Hauser, W Maier, M Rietschel, P Propping, M M Nothen, S Cichon, 2003, *The DTNBP1 (dysbindin) gene contributes to schizophrenia, depending on family history of the disease*:Am J Hum Genet, v.73 p.1438–1443.

Van den Oord, E J, P F Sullivan, Y Jiang, D Walsh, F A O'Neill, K S Kendler, B P Riley, 2003, *Identification of a high-risk haplotype for the dystrobrevin binding protein 1 (DTNBP1) gene in the Irish study of high-density schizophrenia families*: Mol Psychiatry, v.8, p.499-510.

Van Elst, L T, G Valerius, M Buchert, T Thiel, N Rusch, E Bubl, J Hennig, D Ebert, H. M Olbrich, 2005, *Increased prefrontal and hippocampal glutamate concentration in schizophrenia: evidence from a magnetic resonance spectroscopy study*: Biol.Psychiatry, v.58, p.724-730.

Verdoux, H, N Takei, R Cassou de Saint-Mathurin, R M Murray, M L Bourgeois, 1997, *Seasonality of birth in schizophrenia: the effect of regional population density*. Schizophr Res, v23, p.175-180.

Voisey, J, C D Swagell, I P Hughes, B R Lawford, R M Young, C P Morris, 2010, *Analysis of HapMap tag-SNPs in dysbindin (DTNBP1) reveals evidence of consistent association with schizophrenia*: European Psychiatry, v.25, p.314–319

Vogeley, K, P Falkai, 1998, *The cortical dysconnectivity hypothesis of schizophrenia*: Neurol PsychiatryBrain Res, v.6, p.97-106.

Vogeley K, Schneider-Axmann T, Pfeiffer U, et al. *Disturbed gyrification of the prefrontal region in male schizophrenic patients: a morphometric post mortem study*. Am J Psychiatry. 2000;157:34–9.

Waite, A, S C Brown, D J Blake, 2012, *The dystrophin–glycoprotein complex in brain development and disease*: Trends in Neuroscience, v. 35, p. 487-496

Waite, A, C L Tinsley, M Locke, D J Blake, 2009, *The neurobiology of the dystrophin-associated glycoprotein complex*: Ann Med, v. 41, p. 344-359

Weickert, C S, D A Rothmond, T M Hyde, J E Kleinman, R E Straub, 2008, *Reduced DTNBP1 (dysbindin-1) mRNA in the hippocampal formation of schizophrenia patients*: Schizophr. Res., v.98, p.105 – 110 .

Weickert, C S, R E Straub, B W McClintock, M Matsumoto, R Hashimoto, T M Hyde, M M Herman, D R Weinberger, J E Kleinman, 2004, *Human dysbindin (DTNBP1) gene expression in normal brain and in schizophrenic prefrontal cortex and midbrain*: Arch Gen Psychiatry, v.61, p.544-555.

Werner S, D Malaspina, J Rabinowitz, 2007, *Socioeconomic status at birth is associated with risk of schizophrenia: population-based multilevel study*. Schizophr Bull.v., p.331373–1378.

Wiersma, D., F J Nienhuis, R Giel, A de Jong, C J Slooff, 1996, *Assessment of the need for care 15 years after onset of a Dutch cohort of patients with schizophrenia and an international comparison*: Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology, v.31, p.114-121.

Williams, N M, A Preece, D W Morris, G Spurlock, N J Bray, M Stephens, N Norton, H Williams, M Clement, S Dwyer, C Curran, J Wilkinson, V Moskvina, J L Waddington, M Gill, A P Corvin, S Zammit, G Kirov, M J Owen, M C O'Donovan, 2004, *Identification in 2 independent samples of a novel schizophrenia risk haplotype of the dys-trobrexin binding protein gene (DTNBP1)*. Arch Gen Psychiatry, v.61, p.336-344.

Wirth, C, F Schubert, M Lautenschlager, R Bruhl, A Klar, T E Majic, U Lang, A Ehrlich, G Winterer, T Sander, M Schouler-Ocak, J Gallinat, 2012, *DTNBP1 (Dysbindin) Gene Variants: In Vivo Evidence for Effects on Hippocampal Glutamate Status*.: Current Pharmaceutical Biotechnology, v.13, p.1513-1521

Wittchen, H.-U., H Saß, M Zaudig, 1996, *Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen DSM-IV*. Hogrefe Verlag für Psychiatrie, Göttingen, Bern, Toronto, Seattle.

Wittchen, H-U, M Zaudig, T Fydrich, 1997, *SKID Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV Achse I und II*. Hogrefe Verlag für Psychiatrie, Göttingen, Bern, Toronto, Seattle.

World Health Organization, 1994, *International classification of diseases*. 10.ed., WHO, Genf.

Wray, G A, M W Hahn, E Abouheif, J P Balhoff, M Pizer, M V Rockman, L A Romano, 2003, *The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes*: Mol Biol Evol, v20, p.1377-419.

Wright, I C, S Rabe-Hesketh, P W Woodruff, A S David, R M Murray, E T Bullmore, 2000, *Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia*: Am J Psychiatry, v. 157, p.16-25.

Yung, A R, L J Phillips, H P Yuen, S M Francey, C A McFarlane, M Hallgren , 2003, *Psychosis prediction: 12-month follow up of a high-risk ("prodromal") group*. Schizophr Res v. 60, p. 21–32.

Ziegler, A, I R König, 2010, *A Statistical Approach to Genetic Epidemiology*. Wiley-VCH, Weinheim.

Zuo, L, X Luo, H R Kranzler, L Lu, R A Rosenheck, J Cramer, D P van Kammen, J Erdos, D S Charney, J Krystal, J Gelernter, 2009, *Association study of DTNBP1 with schizophrenia in a US sample*. Psychiatr Genet., v.19, p.292-304.

## Danksagung

Ganz herzlichen Dank an alle, die mich beim Schreiben dieser Doktorarbeit unterstützt haben:

Vielen Dank an Prof. Dr. med Peter Falkai, den Direktor der Psychiatrischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, sowie Prof. Hans-Jürgen Möller, seinen Vorgänger, dass ich an der Psychiatrischen Klinik der LMU München forschen und promovieren durfte.

Prof. Dr.med. Dan Rujescu und PD Dr. hum. biol. Ina Giegling gilt mein Dank, weil sie mit ihrer Begeisterung und ihrem Interesse an der molekulärpsychiatrischen Forschung dieses Projekt an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Ludwig-Maximilians-Universität München auf die Beine stellten.

Dr. hum. biol. Annette Hartmann möchte ich danken, weil sie mich stetig motiviert und darin bestärkt hat, neben meinen diversen Jobs und beruflichen Herausforderungen die Doktorarbeit zu Ende zu bringen. Daneben hat sie mich bei Bedarf immer wieder mit erhellenden Informationen zur Statistik und zur anspruchsvollen Materie der Molekulargenetik versorgt.

Dr. hum. biol. Marion Friedl unterstützte mich geduldig mit Rat und Tat bei Fragen rund um die komplizierte labor- und gentechnische Methodik.

Danke auch an die gesamte Arbeitsgruppe, die mit guter Laune, Spaß und Kollegialität dieses umfangreiche Projekt stetig vorangetrieben hat.

Nicht zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank all meinen guten Freunden, die mich auch in schwierigen Phasen „ausgehalten“, gestärkt und unterstützt haben.

Vielen Dank auch an meine bereits verstorbenen Eltern, die die Anfänge meiner Dissertation noch miterlebten, das Endprodukt aber leider nicht mehr in Händen halten konnten. Sie haben ihr Leben lang die Weichen gestellt, dass es überhaupt dazu kommen konnte.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Monika Stiehl, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Genetische Ursachen der Schizophrenie –  
Die Bedeutung von Veränderungen im Dysbindin-1-Gen (DTNBP1)

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, März 2015